UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1952-1953 — N° 372

RECHERCHES SUR LE FRACTIONNEMENT DES PROTÉINES SÉRIQUES PAR LE MOLYBDATE D'AMMONIUM

Travail du Laboratoire de Chimie Biologique et Médicale
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux
(Professeur F. TAYEAU)

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention « PHARMACIE »

Présentée et soutenue publiquement le Mardi 21 Juillet 1953

PAR

James-Édouard-Xavier JOLIN

PHARMACIEN

Né à Marsainvilliers (Loiret), le 1er Octobre 1919.

Examinateurs de la Thèse :

MM. TAYEAU, professeur. ..... *Président*

VITTE, professeur..... *Juges*

PAUTRIZEL, maître de conférences agrégé..

NEUZIL, maître de conférences agrégé .....

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE

1953

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543913_0076

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1952-1953 — N° 372

RECHERCHES SUR LE FRACTIONNEMENT DES PROTÉINES SÉRIQUES

PAR LE

MOLYBDATE D'AMMONIUM

Travail du Laboratoire de Chimie Biologique et Médicale
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux
(Professeur F. TAYEAU)

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention « PHARMACIE »

Présentée et soutenue publiquement le Mardi 21 Juillet 1953

PAR

James-Édouard-Xavier JOLIN

PHARMACIEN

Né à Marsainvilliers (Loiret), le 1er Octobre 1919.

Examinateurs de la Thèse :

MM. TAYEAU, professeur. ..... *Président*

VITTE, professeur..... } *Juges*

PAUTRIZEL, maître de conférences agrégé.. } *Juges*

NEUZIL, maître de conférences agrégé ..... } *Juges*

BORDEAUX

IMPRIMERIE E. DROUILLARD

3, PLACE DE LA VICTOIRE

—

1953

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYENS HONORAIRES : MM. DUPÉRIÉ, CHELLE.
DOYEN : M. PORTMANN. — **ASSESSEUR** : M. SIGALAS.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. A. MANDOUL, GUYOT, ANDÉRODIAS, ROCHER, LANDE, DUVERGEY, CARLES, LEURET, PÉRY, LABAT, CHARRIER, DUBREUIL, MACHEBŒUF, CRUCHET.

PROFESSEURS :

	MM.
Clinique médicale	CREYX / BROUSTET
Clinique chirurgicale	PAPIN / MASSÉ
Clinique d'accouchements	RIVIÈRE
Clinique gynécologique	MAGENDIE
Anatomie pathologique et microscopie clinique	DE GRAILLY
Anatomie	DUFOUR
Anatomie générale et histologie	MAYER
Hygiène et Clinique de la tuberculose	PIÉCHAUD
Médecine légale et médecine du travail	DERVILLÉE
Electroradiologie et clinique d'électricité médicale.	REBOUL
Chimie	MESNARD
Matière médicale	GOLSE
Pharmacie	VITTE
Physiologie	FABRE
Clinique médicale des maladies des enfants.	FONTAN
Zoologie et parasitologie	SIGALAS
Pathologie générale et expérimentale	SARIC
Clinique ophtalmologique.	BEAUVIEUX
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	POUYANNE
Clinique des maladies infectieuses	AUBERTIN
Chimie biologique et médicale	TAYEAU
Physique médicale et pharmaceutique	PIFFAULT
Médecine coloniale et Clinique des maladies exotiques	BONNIN
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	JOULIA
Clinique des maladies des voies urinaires	DARGET
Clinique des maladies nerveuses et mentales	DELMAS-MARSALET
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	PORTMANN
Toxicologie et hygiène appliquée	CASTAGNOU
Clinique odonto-stomatologique	DUBECQ
Botanique et cryptogamie	GIRARD
Thérapeutique	N...

PROFESSEURS SANS CHAIRE :

MM. PERRENS (Maladies mentales), BLANQUET (Physique pharmaceutique).

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS :

	MM.
Parasitologie	PAUTRIZEL
Physiologie	Mlle ROUGIER
Bactériologie	MOUSTARDIER
Anatomie pathologique	LÉGER
Anatomie	RIGAUD
Pharmacie (1re Section)	R. GOLSE
Pharmacie (2e Section)	MASQUELIER / QUILICHINI
Pharmacie (3e Section)	CAZAUX
Biochimie médicale	NEUZIL
Pathologie expérimentale	FAURE

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.
Médecine générale	DUBARRY / F.-J.TRAISSAC / BERGOUIGNAN / LENG-LÉVY / LAVIGNOLLE / MORETTI
Chirurgie générale	LAUMONIER / CHAVANNAZ / VILLAR / TINGAUD / DEPAULIS
Obstétrique	CHASTRUSSE / FAUGÈRE
Ophtalmologie	BESSIÈRE
Oto-rhino-laryngologie	DESPONS
Dermatologie et syphiligraphie	LE COULANT
Pédiatrie et puériculture	VERGER
Médecine légale et médecine du travail	L'ÉPÉE
Electro-radiologie	LACHAPÈLE
Odonto-stomatologie	BENOIT
Urologie	LANGE

AGRÉGÉ LIBRE :

M. MAHON (Obstétrique).

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.
Médecine opératoire	LAUMONIER
Accouchements	CHASTRUSSE
Puériculture	VERGER / PÉRY
Législation pharmaceutique	POPLAWSKI / COUSTOU
Anatomie	CABANIÉ
Cryptogamie	LAUBIE
Obstétricie sociale	MAHON
Organographie et physiologie végétale	TEMPÈRE
Chimie biologique analytique	MARQUEVIELLE
Chimie analytique	BABIN
Pathologie chirurgicale	LAUMONIER / VILLAR
Zoologie pharmaceutique	BAILENGER

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

R.UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

Dont la présence constante m'a aidé à poursuivre ce travail.

A MA FEMME

Faible témoignage de toute ma tendresse.

A MON PETIT FRANÇOIS

A MA PETITE VÉRONIQUE

A MA MÈRE

A PIERRE LALLEMENT

Qu'il trouve ici une preuve de ma vive affection.

A TOUS LES MIENS

A MES CAMARADES DU LABORATOIRE
DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE BORDEAUX

A MES MAITRES DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE PARIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR P. FLEURY

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE
A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS
MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE PHARMACIE
CHEVALIER LE LA LÉGION D'HONNEUR
OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

Dont l'enseignement prestigieux nous a attiré vers la biochimie.
Respectueux hommage.

A MONSIEUR JEAN MARQUEVIELLE

CHARGÉ DE COURS
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

Dont la constante amitié et l'aide précieuse ne nous ont jamais fait défaut.

A NOS JUGES

MONSIEUR LE DOCTEUR E. NEUZIL

MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOCTEUR ÈS SCIENCES

Témoignage de respectueuse sympathie.

MONSIEUR LE DOCTEUR R. PAUTRIZEL

MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

CHEF DE LABORATOIRE AU CENTRE DE PROPHYLAXIE ANTIVÉNÉRIENNE

DOCTEUR ÈS SCIENCES

CROIX DE GUERRE 1939-1945

OFFICIER D'ACADÉMIE

Respectueux hommage.

MONSIEUR LE PROFESSEUR G. VITTE

PROFESSEUR DE PHARMACIE
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

PHARMACIEN DES HÔPITAUX

OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

Qui nous fait le grand honneur de siéger dans notre jury de thèse.
Témoignage de respectueuse reconnaissance.

A NOTRE MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR F. TAYEAU

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOCTEUR ÈS SCIENCES

OFFICIER D'ACADÉMIE

« La dernière chose qu'on trouve en faisant un ouvrage est de savoir celle qu'il faut mettre la première. »

PASCAL.

Et, cependant, rien ne saurait m'être plus agréable que cette occasion de vous exprimer, ici, ma gratitude pour la bienveillance avec laquelle vous m'avez accueilli dans votre laboratoire, et que vous m'avez témoignée tout au long de ce travail.

Il m'eût été difficile de le mener à bonne fin sans vos précieux conseils et votre sollicitude.

Qu'il me soit permis de vous présenter l'expression de ma très vive reconnaissance.

RECHERCHES SUR LE FRACTIONNEMENT DES PROTÉINES SÉRIQUES PAR LE MOLYBDATE D'AMMONIUM

INTRODUCTION

Les recherches effectuées sur les protéines sériques présentent pour le clinicien un intérêt considérable. Qu'il nous suffise de rappeler leur mise en œuvre dans les maladies de la dénutrition, les néphroses, l'hyperthyroïdie, les dysfonctionnements hépatiques, les shocks, les brûlures, les traumatismes, les maladies infectieuses, le myélome multiple, la réanimation, etc.

Les méthodes de fractionnement des protéines sériques surtout ont rendu les plus grands services; ces méthodes sont nombreuses et la plupart d'entre elles, après avoir connu une période de vogue, sont plus ou moins tombées en désuétude.

Dans ce domaine, le clinicien n'envisage pas le problème comme le biochimiste. Ce dernier cherchera surtout à mettre au point un fractionnement qui lui fournira des protéines aussi pures que possible correspondant à des critères bien établis; la technique mise en œuvre est surtout délicate et réalisable non seulement par un opérateur averti, mais encore avec un appareillage coûteux et complexe. Le clinicien se contentera de fractions souvent hétérogènes, mais susceptibles cependant de subir des variations déterminées dans des syndromes bien établis.

La biochimie et la biologie clinique jouent donc chacune leur rôle.

Cette considération permet de comprendre que telle technique, peu intéressante pour le biochimiste, conserve sa valeur pour le clinicien qui désire avant tout de bons tests.

Les multiples formes que peuvent prendre les maladies ont souvent conduit les cliniciens à multiplier ces tests et l'exemple le plus typique est probablement celui des affections hépatiques pour le diagnostic biologique desquelles on peut mettre en jeu des batteries de tests, des claviers sérologiques [21] ou encore des constellations de tests [128], ce que le regretté Fiessinger désignait par « instantané hépatique ».

La mise au point d'une technique nouvelle en protéinologie clinique ne constitue donc pas une simple addition à une liste déjà longue, mais peut présenter un intérêt que l'avenir seul évaluera à sa juste valeur. C'est animé par cette conception que notre Maître, M. le Professeur Tayeau, lorsque nous sommes venu lui demander un sujet de thèse, nous proposa d'étudier le fractionnement des protéines sériques par le molybdate d'ammonium. Le choix de ce sel fut guidé, non par un simple hasard, mais par une étude qu'effectuait notre Maître sur le phénomène d'obstacle de Donaggio.

Ce dernier auteur a décrit, en effet, une réaction basée sur le principe suivant : lorsqu'on mélange, dans des proportions déterminées, une solution de molybdate d'ammonium à une solution de thionine, il ne tarde pas à apparaître un précipité violet. Or certaines urines, en particulier celles provenant d'individus très fatigués, inhibent cette précipitation.

Au cours de ses études sur le mécanisme de cette inhibition, M. le Professeur Tayeau fut amené à étudier le pouvoir inhibiteur exercé par les protéines sériques sur cette précipitation : c'est alors qu'il remarqua que les

diverses fractions protéidiques du sérum exerçaient un effet très différent. Il lui sembla qu'une meilleure connaissance de l'action du molybdate d'ammonium sur les diverses fractions protéidiques du sérum permettrait de mieux comprendre la cinétique de la réaction d'obstacle de Donaggio.

Notre travail tend donc vers un double but : apporter une contribution au fractionnement des protéines sériques avec une application clinique éventuelle de la technique mise au point; fournir des données pour l'étude du phénomène d'obstacle de Donaggio.

Notre thèse comprendra deux parties :

1° Nous rappellerons tout d'abord les principales techniques mises en jeu pour le fractionnement des protéines sériques et nous fournirons quelques données sur le molybdate d'ammonium utilisé dans nos recherches (chapitres I et II).

2° Nous exposerons ensuite nos recherches expérimentales et les applications auxquelles elles ont conduit (chapitres III à VII).

Qu'il nous soit permis, avant de clore cette introduction, d'adresser nos remerciements à notre camarade de laboratoire, M. Jean Marquevielle, chargé de cours à la Faculté, qui nous a fait profiter de ses connaissances et dont l'aide nous a été extrêmement précieuse.

Nous voulons remercier également Mme Plazy, agent technique au C. N. R. S., dont l'habileté technique a été souvent mise à contribution.

Enfin, à notre Maître, M. le Professeur Tayeau, qui, après nous avoir inspiré le sujet de cette thèse, nous a constamment guidé dans sa réalisation, nous voulons adresser nos plus vifs remerciements et l'expression de notre respectueuse gratitude.

CHAPITRE PREMIER

LE FRACTIONNEMENT DES PROTÉINES SÉRIQUES

Le fractionnement des protéines du sérum sanguin, qui constitue aujourd'hui l'une des questions les plus délicates de la biochimie moderne en raison du nombre considérable de fractions (*cf.* Roche et Derrien [100]), a présenté, dès les toutes premières recherches, une certaine complexité.

Entre 1850 et 1860 ont été publiés sur ce sujet — tant en France qu'en Allemagne — un certain nombre de mémoires qui ont amené beaucoup de confusion.

Les deux grands chefs d'école auxquels revient le mérite d'avoir abordé ce sujet à la fois si difficile et si utile restent incontestablement Panum [87], en Allemagne, et Denis [23], en France.

Le premier a proposé pour le fractionnement des protéines sériques l'addition au sérum d'eau distillée, ce qui amène la précipitation d'une fraction, tandis qu'une autre reste en solution; le second a mis en jeu le sulfate de magnésium à saturation (*).

(*) Nous ne donnerons pas de détails sur ces techniques qui ne présentent plus à présent qu'un intérêt historique. Si le lecteur désirait néanmoins des détails, il en trouverait dans : « Robin C. — Essais sur les humeurs normales et morbides du corps de l'Homme. 1 vol., Baillière, édit., Paris, 1874 »; voir p. 62.

De nombreux auteurs ont alors apporté des modifications aux modalités de la précipitation : il en est résulté une floraison de néologismes qui ont sérieusement compliqué le problème, et dont quelques-uns seulement ont été conservés : c'est ainsi qu'ont été créés les termes de « sérum caséine » [87], « substances fibrinoplastiques » [105], « globulines » [105], « fibrine dissoute » [87], « sérine » [23], « métalbumine » [104], « sérosine » [18], « bioxyprotéine » [85], etc.

Le pire est que des fractions identiques ont souvent reçu des noms différents; d'autre part, des fractions très différentes ont reçu le même nom. Divers auteurs, et en particulier Machebœuf, Tayeau et Battut [75], puis Tayeau et Martin [118], ont mis en garde contre les appellations inexactes et ils conseillent de ne jamais utiliser de nom de fractions protéidiques, sans mentionner la technique qui a permis leur obtention.

I. — FRACTIONNEMENT PAR DIVERS SELS

[voir 124]

A la suite des travaux de Denis [23, 24], de nombreux sels minéraux ont été mis en jeu pour le fractionnement des protéines sériques. Mentionnons le sulfate de magnésium [23], le sulfate d'ammonium (Michaïlow [82], Kauder [53], Pohl [92], Hofmeister [44]), le sulfate de sodium (Homer [45], Pinkus [91], Howe [47], etc.), l'acétate de sodium [60], le sulfate de cuivre [52] ,le citrate de sodium [49], le sulfite de sodium [11], l'hyposulfite de sodium [38], le glycinate de zinc [16, 58], les phosphates, etc.

Signalons encore que l'on a proposé pour le fractionnement les acides borique [37] et sulfosalicylique [2]. Quelques-uns seulement parmi ces divers sels restent encore utilisés, principalement le sulfate de sodium, le sulfate d'ammonium et le sulfite de sodium [32, 48].

A. — Fractionnement par le sulfate de sodium

Le sulfate de sodium proposé jadis par Homer [45] et Pinkus [91] a surtout été bien étudié par Howe [47]. Cet auteur conclut que losque le sérum contient 22 p. 100 de sulfate de sodium, la précipitation des globulines est totale, tandis que les albumines restent en solution.

Cette technique, souvent mise en œuvre dans des recherches modernes [120, 84], a fait l'objet d'intéressants travaux concernant la séparation des diverses fractions globuliniques (Majoor [77], Kibrick [54]) et l'homogénéité électrophorétique des fractions obtenues [96, 76].

B. — Fractionnement par le sulfate d'ammonium

Hofmeister [44] a réalisé le premier une étude systématique concernant le fractionnement des protéines sériques par le sulfate d'ammonium. Cet auteur a noté que, si l'on ajoute progressivement en agitant du sulfate d'ammonium à du sérum sanguin, il se forme un précipité qui augmente avec la concentration saline, mais, dès que cette concentration atteint la demi-saturation, le précipité n'augmente plus et il faut alors élever très nettement la concentration en sel pour voir apparaître la précipitation d'une nouvelle fraction. Si donc on trace la courbe représentative des variations du poids de protéines précipitées en fonction du poids de sulfate d'ammonium ajouté au sérum, on constate que cette courbe comporte un palier, qui sépare deux fractions distinctes; ce palier correspond à la demi-saturation du sérum en sulfate d'ammonium.

Hofmeister considère que la première fraction (insoluble dans le sulfate d'ammonium à demi-saturation) représente les *globulines,* tandis que la seconde (soluble dans ces conditions) est constituée par les *albumines.*

Cette technique a fait l'objet, par la suite, de très nombreux perfectionnements. Mentionnons en passant les travaux de Lewith [60], Wierner [127], Schmitz [106],

Boutroux [8], Hooft [46] et insistons particulièrement sur ceux de Mme Roche et coll. [98, 99], de Jorgensen [50], de Henriques et Klausen [42] et de Baudouin, Lewin et Hillion [3], qui ont bien précisé les modalités selon lesquelles il faut opérer pour obtenir des résultats fidèles et dignes d'être interprétés cliniquement.

En dehors de ces applications strictement cliniques, la méthode au sulfate d'ammonium a été utilisée à des fins purement scientifiques [6, 9].

II. — FRACTIONNEMENT PAR LES SOLVANTS ORGANIQUES

Piettre et Vila ont montré que l'acétone permet la séparation des deux grandes fractions protéidiques; si, en effet, on traite par de l'eau pure le précipité obtenu par addition d'un certain volume d'acétone à du sérum neutralisé, les globulines s'insolubilisent, tandis que les albumines restent en solution. De multiples travaux ont été publiés sur cette technique, qui a reçu de nombreuses modifications [voir 7].

La technique de Pillemer et Hutchinson [90], au méthanol (*) bien étudiée ou complétée par Henriques et Klausen, par Bock [5], par Fasoli [29, 30], puis par Machebœuf et coll. [66], trouve actuellement un regain d'actualité en raison de l'homogénéité électrophorétique des fractions obtenues.

Mentionnons encore la technique de Delsal [22] utilisant le mélange méthanol-méthylal et qui donne des résultats tout à fait comparables à ceux obtenus avec le sulfate d'ammonium à demi-saturation (**).

(*) Lorsque le sérum, porté à 0° C. et à *p*H 6,7 à 6,9, contient 42,5 p. 100 de méthanol, les globulines précipitent, tandis que les albumines restent en solution.

(**) L'addition de 5,5 cm³ d'un mélange à parties égales de méthanol et de méthylal à 10 cm³ de sérum amène la précipitation des globulines, tandis que les albumines restent en solution.

Il convient enfin de réserver une place toute particulière au fractionnement par l'alcool à basse température. Cette technique, due à Cohn et Edsall [16, 17], permet l'isolement de fractions parfaitement définies. Cependant, cette technique, qui présente surtout un intérêt industriel en raison des conditions matérielles qu'elle requiert, ne saurait être appliquée pratiquement.

III. — FRACTIONNEMENT PAR LES RÉSINES ET PAR LES DÉTERGENTS

Les détergents synthétiques, dont les multiples applications ont fait l'objet de tant de travaux, allaient trouver une nouvelle application dans le fractionnement des protéines sériques. Signalons les recherches de Freudenberg et Stumpf [34], puis de J. Polonovski [93] avec les saponiums, celles de Loomeijer [62] avec le désogène et celles de Neuzil [86] avec les carbowax. L'addition de quantités déterminées de détergent au sérum, dans des conditions bien définies, permet le fractionnement de ce sérum.

Les résines synthétiques, enfin, peuvent encore être utilisées avec fruit, soit dans le fractionnement des protéines sériques [97], soit pour l'isolement d'une fraction déterminée [4].

IV. — FRACTIONNEMENT AU MOYEN DE L'ÉLECTROPHORÈSE

On sait que les protéines sériques ne supportent pas toutes des charges électriques équivalentes. Si donc on les soumet à un champ électrique, elles migrent vers l'électrode de signe contraire à leur charge, et cela d'autant plus rapidement que leur ionisation est plus grande. Cette constatation très ancienne (Quincke, Ostwald, Helmholzt,

Nernst, etc.) a conduit à la mise au point d'un appareil perfectionné (Tiselius) permettant non seulement de réaliser des recherches pures, mais encore d'apporter à la clinique d'utiles renseignements.

Le principe consiste donc à soumettre à l'action d'un champ électrique et à un *p*H donné, généralement situé aux environs de 8, le sérum. Les protéines, toutes ionisées négativement, migrent vers l'électrode positive, et cela d'autant plus vite qu'elles sont plus ionisées. Un dispositif optique permet l'obtention d'un diagramme, qui rend compte, non seulement du nombre de fractions différentes, mais encore de leur abondance. La figure 1 représente un tel diagramme dans lequel on peut caractériser les albumines, puis trois fractions globuliniques désignées par α, β et γ. Chez l'individu normal ou chez l'animal normal, le diagramme présente l'aspect classique, mais il n'en est pas de même au cours de certains états pathologiques (maladies infectieuses,

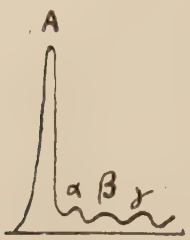

Fig. 1.

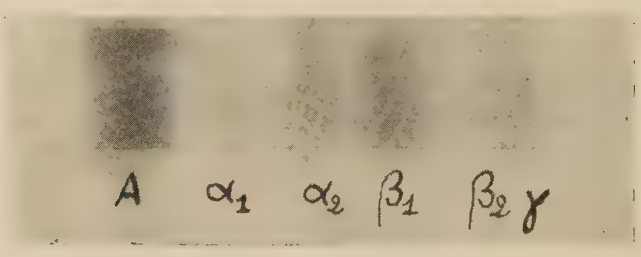

Fig. 2.

néphrose lipoïdique, myélome multiple) ; on observe alors non seulement des variations quantitatives parfois considérables, mais encore des fractions anormales. Malgré la mise au point d'appareils simplifiés (Machebœuf et Monnier [70]), l'électrophorèse différentielle reste une technique délicate et surtout onéreuse.

Il y a quelques années, on a proposé la micro-électrophorèse sur papier (Durrum [27], Cremer et Tiselius [19], Machebœuf, Rebeyrotte et Brunerie [71]), qui permet d'obtenir dans ce domaine d'excellents résultats. La figure 2 représente le diagramme obtenu avec un sérum normal à l'aide de l'appareil de Machebœuf et Rebeyrotte.

V. — FRACTIONNEMENT DES GLOBULINES

Les premières recherches sur le fractionnement des globulines sériques sont dues à Marcus [79]; cet auteur avait noté que, si l'on élimine d'un sérum les globulines qui s'insolubilisent par dilution du milieu, il reste encore une abondante quantité de globulines précipitables par le sulfate d'ammonium à demi-saturation. A la première fraction, correspondant aux globulines insolubles dans l'eau pure, Marcus a donné le nom d'*euglobulines;* les autres furent désignées par le nom de *pseudoglobulines.* Ces deux sous-fractions peuvent être aisément séparées par dialyse contre de l'eau distillée de la solution de globulines (Quinnan [95]). D'autres auteurs, cherchant probablement à éviter la dialyse, ont proposé de séparer les euglobulines par précipitation à l'aide de sulfate d'ammonium saturé au tiers, tandis que les pseudoglobulines correspondaient à la fraction précipitant entre le tiers et la demi-saturation (Porges, Fuld, Spiro [36, 94]). Il a été démontré que ces deux techniques ne donnent pas des résultats identiques (Tayeau et M^lle^ Martin [118]).

On a cherché à savoir si ces deux sous-fractions, euglobulines et pseudoglobulines, étaient réellement bien différenciées et si le caractère de solubilité dans l'eau pure qui sert à les définir représentait un critère suffisant. On a pu montrer que la différence de solubilité entre ces deux fractions devait être rattachée à la présence des lipides (Machebœuf et Tayeau [74]) ou plus exactement des phosphatides (Tayeau [114]) qu'elles contiennent. Néan-

moins, le fractionnement des globulines présente quand même un intérêt certain en raison de ses applications en sérothérapie (préparation des sérums purifiés).

VI. — FRACTIONNEMENT DES ALBUMINES

Divers auteurs (Halliburton [39], Sœrensen [109], Sandor, Bonnefoi et Pérez [103], etc.) ont tenté de fractionner les albumines. Or, il semble que les diverses fractions obtenues par ces auteurs ne diffèrent entre elles que par les lipides qu'elles entraînent avec elles dans leur précipitation : si, en effet, on enlève les lipides par une technique appropriée, les diverses fractions, qui présentaient primitivement des caractères très différents (effet osmotique, *p*H isoionique), deviennent identiques (Macheboeuf et Januskiewicz [68], Macheboeuf et Duboy [67]).

Le fractionnement des globulines ou des albumines suivant les anciennes techniques ne présente plus qu'un intérêt très relatif depuis la découverte de l'électrophorèse. Il est d'ailleurs possible à présent, en combinant diverses techniques de relargage, de séparer les fractions globuliniques électrophorétiques (voir à ce sujet Ardry [1]). On peut même, avec la technique utilisant l'alcool et le froid (Cohn et Edsall [16]), obtenir un très grand nombre de fractions bien définies à l'électrophorèse; mais cette dernière technique n'est réalisable que dans des laboratoires très bien outillés [voir 65].

Quelle valeur convient-il d'attribuer à ces diverses méthodes de fractionnement ? Laquelle, parmi toutes les techniques précitées, permet de séparer d'une manière satisfaisante les albumines des globulines ?

Voilà des questions auxquelles il est très difficile, sinon impossible, de répondre : cela dépend de la définition donnée aux diverses fractions; une globuline électrophorétique n'est pas tout à fait identique à une globuline

d'hypercentrifugation, elle-même différente d'une globuline obtenue par relargage salin.

L'hétérogénéité des protéines sériques rend le problème du fractionnement fort complexe. Cette constatation ne saurait néanmoins amener le découragement, car les besoins de la clinique n'exigent pas l'obtention de fractions absolument pures. Les rapports albumines/globulines demandés par les cliniciens ne sont en réalité que des tests; l'essentiel est que ces derniers se modifient au cours des divers états pathologiques. Il importe néanmoins de ne jamais mentionner les termes albumines, globulines, euglobulines, pseudoglobulines, α, β ou γ-globulines sans préciser la technique qui a permis d'obtenir ces fractions.

VII. — LES TESTS PROTÉIDIQUES DE DYSFONCTIONNEMENT HÉPATIQUE (*)

C'est dans le foie que s'édifie une grande partie des protéines sériques : c'est le cas pour les albumines, les plus abondantes chez l'Homme, et pour certaines globulines.

En cas d'atteinte hépatique, la protéinogenèse se trouve toujours parmi les premières fonctions perturbées : le taux des albumines sériques subit une diminution sensible. Dans certains cas, cette diminution est considérable et, dans la cirrhose atrophique de Laennec par exemple, il est courant de rencontrer des rapports albumines/globulines inférieurs à l'unité, alors que le chiffre normal est de 1,5.

La plupart des hyposérumalbuminémies s'accompagnent d'une hyper γ-globulinémie. Chez de nombreux hépatiques, on a donc une augmentation des protéines les moins solubles (γ-globulines) et une diminution des protéines les

(*) On trouvera d'intéressants détails sur cette question dans les rapports du Congrès de Vichy, 1950. *Bull. Assoc. Etudes physiopathol. Foie, Nutr.*, 1950, **5**, 11 à 229, et dans la revue de Ardry [1].

plus solubles (albumines) ; on conçoit aisément que cette perturbation puisse se refléter dans les diverses techniques mettant en jeu l'insolubilisation des protéines sériques. Le phénomène devient d'ailleurs d'autant plus sensible qu'à l'état normal, les albumines s'opposent souvent à l'insolubilisation des γ-globulines [76, 81] ; dans les dysfonctionnements hépatiques, la γ-globuline précipite donc d'autant mieux que les albumines se trouvent diminuées.

Les tests hépatiques consistent à mettre en évidence, soit le début de la précipitation, soit l'intensité du louche obtenu par addition au sérum d'un réactif précipitant. Ces divers tests diffèrent donc les uns des autres par la nature de ce réactif et ses conditions d'action.

Parmi les principaux réactifs utilisés, mentionnons le formol (réaction dite formo-gel de Gaté et Papacostas [voir 83]), le bichlorure de mercure (réaction de Takata-Ara, réaction de Gros [voir 28]), le chlorure de calcium (réaction de Weltmann [voir 35]), le sulfate de cadmium (réaction de Wuhrmann et Wunderly [128]), la céphaline et le cholestérol (réaction de Hanger [40]), le thymol (réaction de Mc Lagan [76]), le sulfate de zinc (réaction de Kunkel [56]), etc. (*).

« Le nombre et la diversité des tests semblent, au premier abord, faits pour rebuter le clinicien. L'idéal serait évidemment de disposer d'un test unique, global et polyvalent. On n'y peut raisonnablement songer, car les études modernes de physiopathologie ont fait connaître le rôle complexe du foie, laboratoire central de l'organisme, régulateur de la plupart des grands métabolismes. Elles ont mis en lumière ses fonctions excrétoires, antitoxiques ou sanguines. Il est aisé de comprendre, dans ces conditions, la quantité et la variété considérables des méthodes d'exploration proposées pour interroger de si multiples activités. A qui veut apprécier la valeur fonctionnelle de la cellule hépatique, s'impose donc l'emploi de tests multiples.

(*) On trouvera de nombreux détails sur ces réactions dans [1] et [15].

chaque test n'explorant qu'une seule des nombreuses fonctions du foie. Cette étude plurifonctionnelle paraît d'autant plus nécessaire que si, à l'état normal, existe une synergie entre les diverses fonctions, on voit apparaître à l'état pathologique une asynergie, les unes pouvant être profondément perturbées, alors que les autres restent normales.

« Pris isolément, aucun test n'a une valeur absolue, ni pour le pronostic, ni pour le diagnostic, d'autant plus que chacun d'eux peut donner, d'un jour à l'autre, des résultats nettement différents. Cette nécessité du contrôle des tests les uns par les autres s'impose, en particulier, pour les recherches modernes de sérologie hépatique, car les différents tests de floculation comportent des significations et des mécanismes différents. Pourquoi d'ailleurs agirait-on, dans ce domaine, autrement qu'on ne le fait pour la sérologie de la syphilis où la pluralité des tests sérologiques est très généralement considérée comme nécessaire (Chiray [15]) ? »

Les conceptions que nous avons émises dans notre introduction rencontrent celles du Professeur Chiray. Notre désir d'étudier par une nouvelle technique le fractionnement des protéines sériques et l'équilibre protéidique au cours de diverses affections hépatiques a justement été dicté par ces conceptions. L'agent précipitant mis en jeu dans nos recherches est le molybdate d'ammonium (*). Avant d'exposer le résultat de nos travaux, nous ne pensons pas inopportun de donner quelques renseignements sur ce sel.

(*) Il importe d'insister sur le fait que la constatation d'un déséquilibre protéinique n'implique pas nécessairement l'existence d'un trouble hépatique. Les divers tests du dysfonctionnement hépatique ne sont pas spécifiques.

CHAPITRE II

LE MOLYBDATE D'AMMONIUM

Les molybdates constituent des sels extrêmement complexes; lorsqu'ils se trouvent en solution aqueuse, ils forment des composés parfois mal définis; la plupart du temps, il s'agit en réalité de mélanges.

Le problème des molybdates alcalins s'avère particulièrement touffu car les combinaisons que donne l'acide molybdique avec les bases alcalines sont fort nombreuses. Le problème des molybdates de métaux lourds est beaucoup plus simple, car les sels obtenus dérivent tous de l'ion $(MoO_4)^{--}$.

Il semble que la plupart des auteurs, ayant mis en jeu le molybdate d'ammonium pour des recherches biologiques, n'aient pas insisté comme il convient sur cette notion essentielle : en effet, suivant les conditions expérimentales, on se trouve en présence de dérivés variés (Ullik [125]). Qu'il nous suffise, pour fixer les idées, de faire appel à la réaction de Donaggio, dans laquelle l'auteur met en jeu une solution de molybdate d'ammonium légèrement acidifiée par de l'acide chlorhydrique : dans ce dernier cas, on se trouve en présence d'un paramolybdate en équilibre avec un tri et un tétramolybdate.

Ces quelques remarques suffisent à montrer l'intérêt que présente une courte mise au point sur le molybdate d'ammonium, sel mis en jeu dans nos recherches.

I. — LES MOLYBDATES ALCALINS

Tous ces molybdates dérivent de deux ions seulement [122] :

1° L'ion tétramolybdique : $(4\ MoO_3,\ O)^{--}$;

2° L'ion molybdique normal : $(MoO_4)^{--}$.

On définit cinq grands groupes de molybdates alcalins.

1° *Les molybdates acides,* dans lesquels le rapport du nombre de molécules d'acide à celui de base est supérieur à 4.

Parmi ces molybdates acides, les principaux sont :

a) Les décamolybdates : $10\ MoO_3,\ R_2O,\ n\ H_2O$;

b) Les octomolybdates : $8\ MoO_3,\ R_2O,\ n\ H_2O$.

Ces molybdates doivent être considérés comme des produits d'addition d'anhydride molybdique anhydre MoO_3 et de tétramolybdate $(4\ MoO_3,\ O)^{--}$.

2° *Les tétramolybdates,* appelés encore *métamolybdates,* dans lesquels le rapport est égal à 4.

3° *Les trimolybdates,* dans lesquels le rapport est égal à 3.

Ces sels dérivent en réalité d'un équilibre entre les ions tétramolybdique et molybdique normal :

$$2\ (4\ MoO_3,\ O)^{--} + 1\ (MoO_4)^{--} \rightleftarrows 3\ (3\ MoO_3,\ O)^{--}.$$

4° *Les paramolybdates,* appelés encore *heptamolybdates,* dans lesquels le rapport est égal à 7/3.

Ces sels dérivent, théoriquement tout au moins, d'un équilibre entre les deux ions tétramolybdique et molybdique normal :

$$4\ (4\ MoO_3,\ O)^{--} + 5\ (MoO_4)^{--} \rightleftarrows 3\ (7\ MoO_3,\ 3\ O)^{------}.$$

On a beaucoup discuté sur la constitution des paramolybdates. Il semble que la formule du paramolybdate d'ammonium serait en réalité :

$$12\ MoO_3,\ 5\ (NH_4)^2,\ 7\ H_2O.$$

Ce corps correspondrait à des cristaux mixtes de para-

molybdate véritable (7 MoO_3, 3 O) $(NH_4)^6$ et de trimolybdate (3 MoO_3, O) $(NH_4)^2$ (Rosenheim).

5° *Les molybdates normaux*, dans lesquels le rapport est égal à l'unité.

II. — LES MOLYBDATES D'AMMONIUM [voir 12]

Le molybdate d'ammonium peut être obtenu par évaporation d'une solution d'acide molybdique préalablement additionnée d'ammoniaque en excès. En raison de ce dernier excès, on pourrait s'attendre à obtenir un sel neutre; il n'en est rien et, dans ces conditions, on obtient le *paramolybdate*, qui constitue d'ailleurs le sel commercial.

En acidifiant plus ou moins une solution de paramolybdate, on prépare des sels plus acides. En la traitant par l'ammoniaque, on obtient le sel neutre.

Voici quels sont, pour une acidification effectuée à l'aide d'acide chlorhydrique, les *p*H de précipitation optima de divers molybdates d'ammonium :

*p*H 0,9 : octo et décamolybdates;
*p*H 2,6 à 3 : tétramolybdates;
*p*H 3 à 5,9 : trimolybdate dihydraté.

L'addition d'ammoniaque conduit à :

*p*H 6,2 à 6,4 : aux paramolybdates;
*p*H 6,8 à 10,4 : aux molybdates normaux.

Le *p*H optimum pour l'obtention des molybdates normaux est de 9,8.

III. — PRÉPARATION ET STABILITÉ DES MOLYBDATES D'AMMONIUM

Cette étude, réalisée surtout par Travers et Malaprade [122], a conduit aux observations suivantes :

1° Le molybdate neutre, soit à l'état sec, soit en solution, se dissocie rapidement en perdant de l'ammoniac et

en se transformant en sel acide [123]; on aboutit ainsi peu à peu au trimolybdate. Il est précipité de ses solutions par l'alcool, propriété utilisée pour son obtention. La solution de molybdate neutre évaporée conduit à l'obtention du paramolybdate; ce dernier, remis en solution, est aisément précipité par l'alcool.

Ces constatations sont propres au molybdate d'ammonium, car les autres molybdates alcalins présentent des solutions très stables au sein desquelles il est aisé de les faire cristalliser (Malaprade [78]).

2° Le paramolybdate d'ammonium s'obtient par recristallisation au sein de sa solution. Le paramolybdate en solution se dissocie peu à peu et le degré de dissociation est fonction de la concentration. La solution de paramolybdate possède la propriété de donner une réaction propre à l'acide tétramolybdique (réaction colorée avec le ferrocyanure de potassium). Cette réaction s'explique aisément lorsque l'on considère, comme nous l'avons signalé précédemment, que les paramolybdates dérivent d'un équilibre entre les deux ions, tétramolybdique et molybdique normal :

$$3\ (7\ MoO_3,\ 3\ O)^{--------} \rightleftarrows 4\ (4\ MoO_3,\ O)^{--} + 5\ (MoO_4)^{--}.$$

3° Le trimolybdate d'ammonium peut être obtenu par simple évaporation à 100° C des solutions de tétramolybdate. Cette obtention s'explique ainsi : l'ion tétramolybdique en présence d'eau donne :

$$(1)\quad 4\ (4\ MoO_3,\ O)^{--} + 3\ H_2O \rightleftarrows 3\ (4\ MoO_3,\ H_2O) + 4\ (MoO_4)^{--}.$$

L'ion tétramolybdique réagit alors sur l'ion molybdique et conduit au trimolybdate :

$$(2)\quad 2\ (4\ MoO_3,\ O)^{--} + 1\ (MoO_4)^{--} \rightleftarrows 3\ (3\ MoO_3,\ O)^{--}.$$

Ce mode de préparation n'est pas le plus utilisé; on lui préfère celui qui consiste à ajouter de l'acide chlorhydrique en quantité déterminée (*p*H 4 environ, virage de l'hélianthine) à la solution de paramolybdate ou de molybdate normal :

$$6\ ClH + 4\ MoO_4R_2 \rightleftarrows (4\ MoO_3,\ O)\ R_2 + 6\ RCl + 3\ H_2O.$$

On retombe alors sur l'équilibre (1) ; la suite des réactions est identique.

4° Le tétramolybdate d'ammonium s'obtient par addition d'acide chlorhydrique en quantité déterminée au paramolybdate [121]. Ce sel ne perd pas son ammoniac. Il est beaucoup plus soluble dans l'eau chaude qu'à froid et cette propriété est utilisée pour sa cristallisation. Il est partiellement dissocié en solution aqueuse, en acide tétramolybdique et molybdique normal :

$$4\,(4\,MoO_3,\,R_2O) + 3\,H_2O \rightleftarrows 3\,(4\,MoO_3,\,H_2O) + 4\,MoO_4H_2.$$

5° Les molybdates acides s'obtiennent par acidification des solutions de molybdate commercial.

IV. — CONSIDÉRATIONS SUR LES SOLUTIONS DE MOLYBDATE D'AMMONIUM ET LEUR COMPOSITION

Il ressort de l'étude ci-dessus que le problème des molybdates d'ammonium s'avère particulièrement complexe. Nous ne devons pas perdre de vue le côté pratique et il

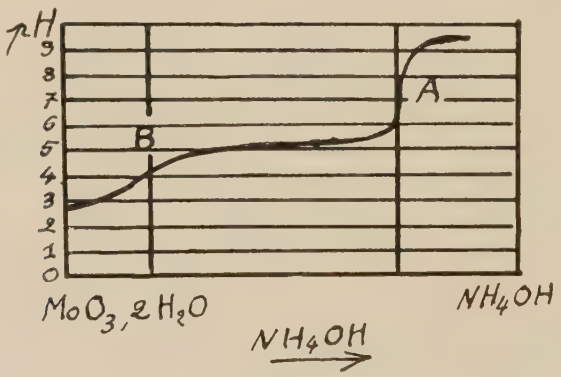

Fig. 3.

importe de connaître quelle est la composition d'une solution de molybdate commercial à un *p*H donné. C'est à cette étude que se sont attachés Travers et Malaprade [122, 123], qui ont étudié la courbe de neutralisation de l'hydrate

molybdique (MoO_3, 2 H_2O) par l'ammoniaque en fonction du *p*H (fig. 3).

Cette courbe présente deux tangentes d'inflexion (A et B) :

— L'une située sur la portion verticale, qui correspond à la formation de molybdates neutres;

— L'autre, inclinée sur la verticale, qui se place lorsque la neutralisation a atteint le quart de sa valeur.

Ces faits s'expliquent lorsque l'on considère que la solution molybdique renferme des molécules d'un acide condensé, l'acide tétramolybdique :

$$(4\ MoO_3,\ OH_2) \rightleftarrows (4\ MoO_3,\ O)^{--} + 2\ H^+.$$

Cet acide, instable en milieu concentré, serait décomposable par les bases et conduirait à la formation de molybdate neutre en passant par tous les molybdates intermédiaires, tri et paramolybdates.

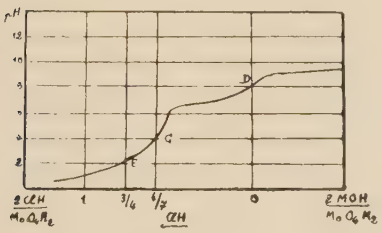

Fig. 4.

La courbe de neutralisation ne présentant pas de point d'inflexion entre les deux points A et B, on peut en conclure que les tri et paramolybdates d'ammonium doivent donc exister en équilibre avec les corps qui les précèdent et avec ceux qui les suivent sur la courbe de neutralisation. Pour un rapport MoO_3/base déterminé, il n'y a qu'un seul équilibre en solution.

Ces constatations ne sont cependant pas admises par tous. Mettant en jeu une technique légèrement différente, Carrière et Guiter [13] sont parvenus à une autre conclusion. Ces auteurs prétendent que les constatations de Malaprade, valables pour les sels de sodium et de lithium, ne le sont plus lorsqu'il s'agit des sels d'ammonium. Etudiant les courbes d'acidification du molybdate d'ammonium par l'acide chlorhydrique, Carrière et Guiter observent deux points d'inflexion (C et D, fig. 4).

La deuxième tangente d'inflexion, située aux 4/7 de la neutralisation, est en faveur de l'existence d'ions stables en solution de paramolybdate; cette constatation est en parfait accord avec la stabilité du produit en cristaux et avec sa facilité d'obtention. La troisième tangente d'inflexion (E), située aux 3/4 de la neutralisation et correspondant au point B de Malaprade, est selon Carrière et Guiter, négligeable.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE II

Il ressort de toutes ces études que la solution de molybdate d'ammonium commercial, la plus souvent mise en jeu dans nos expériences, est en réalité une solution de paramolybdate en équilibre avec des tri et des tétramolybdates.

Si nous avons cru opportun d'insister sur la nature des solutions de molybdate, c'est non seulement en raison de la faible place accordée généralement à cette question, mais surtout à cause de leurs propriétés biologiques différentes et de leur action différente également sur les protéines du sérum sanguin.

CHAPITRE III

ACTION DU MOLYBDATE D'AMMONIUM SUR LES PROTÉINES DU SÉRUM SANGUIN

Nous avons eu l'occasion, dans notre introduction, d'expliquer les raisons qui nous ont amené à étudier l'action exercée par le molybdate d'ammonium sur la solubilité des diverses fractions protéidiques du sérum sanguin. Nous avons abordé nos recherches par une série d'essais préliminaires destinés à limiter notre étude.

I. — ESSAIS PRÉLIMINAIRES

Nous avons préparé une solution aqueuse de molybdate d'ammonium à 4 p. 100; ce titre est celui utilisé par Donaggio pour la mesure du phénomène d'obstacle. Nous avons placé cette solution dans une burette et nous l'avons versée goutte à goutte dans 5 cm^3 de sérum de Cheval. Nous constatons alors que les premières gouttes ne font apparaître aucun trouble, mais qu'un précipité se produit lorsque nous avons versé 1,3 cm^3 de solution de molybdate; le précipité formé augmente et devient plus abondant lorsqu'on ajoute une nouvelle quantité de solution. Nous avons ajouté ainsi 5 cm^3 de la solution de molybdate d'ammonium; il est apparu à ce moment que le précipité n'augmentait plus. Après centrifugation, permettant l'éli-

mination du précipité, nous avons constaté, grâce au réactif trichloracétique, que les eaux-mères contenaient encore une très appréciable quantité de protéines. Ce premier essai nous permet de conclure que le molybdate d'ammonium précipite une partie des protéines du sérum sanguin.

Nous avons réalisé ensuite une nouvelle série d'essais portant, non plus sur le sérum total, mais sur les diverses fractions protéidiques sériques : les euglobulines, les pseudoglobulines et les albumines.

Pour la séparation de ces trois fractions, nous avons mis en jeu la méthode d'Hofmeister [44] et de Marcus [79]. Nous avons placé tout d'abord dans un tube à centrifuger un certain volume de sérum que nous avons mélangé avec un volume égal de solution saturée et neutralisée de sulfate d'ammonium. Les globulines totales qui précipitent par centrifugation ont été recueillies et les eaux-mères qui constituent la solution des *albumines* dialysées contre de l'eau physiologique. Le précipité de globulines, remis en suspension dans de l'eau, est soumis à la dialyse contre de l'eau ordinaire, puis contre de l'eau distillée jusqu'à élimination des petits ions. Dans ces conditions, on obtient un précipité qui constitue les *euglobulines* et une solution qui contient les *pseudoglobulines*.

Les euglobulines sont remises en suspension dans de l'eau à laquelle on ajoute du chlorure de sodium afin d'amener la concentration saline aux environs de 9 p. 1.000. La solution des pseudoglobulines est également additionnée de chlorure de sodium (9 p. 1.000). On obtient ainsi trois solutions : *euglobulines, pseudoglobulines, albumines*.

L'addition de molybdate d'ammonium à la solution des euglobulines donne tout de suite un précipité qui augmente d'intensité avec l'addition de molybdate. Cependant, il semble qu'une partie du précipité protéidique se redissout lorsqu'on augmente de nouveau la concentration en molybdate.

La solution des pseudoglobulines amène également la formation d'un précipité sous l'influence du molybdate, mais la précipitation paraît moins intense que dans le cas des euglobulines; la redissolution du précipité, pour de fortes concentrations en molybdate, se montre ici très nette.

Enfin, la solution des albumines ne précipite pas du tout sous l'influence du molybdate d'ammonium.

Ces essais sur les trois fractions protéidiques du sérum permettent donc de conclure que les euglobulines et les pseudoglobulines sont précipitées au moins partiellement par le molybdate d'ammonium.

Dans le deuxième chapitre de notre étude théorique, nous avons insisté sur le rôle essentiel joué par le *p*H de la solution de molybdate utilisée. La solution, à laquelle il est fait allusion dans nos essais préliminaires, présentait un *p*H de 5,5; nous nous sommes demandé si, après avoir amené la solution de molybdate au *p*H du sang (7,35), la précipitation des protéines serait identique. Nous avons réalisé l'expérience et nous avons pu noter que l'addition au sérum d'une solution de molybdate préalablement amenée à *p*H 7,35 à l'aide d'ammoniaque ne provoque pas l'apparition de précipité.

Il convient de noter que le pouvoir précipitant exercé par le molybdate d'ammonium (solution *p*H 5,5) sur les protéines du sérum n'est pas dû exclusivement au *p*H de la solution, car une solution chlorhydrique de même *p*H ajoutée au sérum ou à la solution des diverses fractions protéidiques n'amène aucune précipitation.

Ces essais préliminaires nous ont incité à étudier quantitativement la précipitation des protéines sériques par le molybdate d'ammonium.

II. — A LA RECHERCHE D'UNE TECHNIQUE PERMETTANT LE DOSAGE RAPIDE ET EXACT DES PROTÉINES SÉRIQUES

Ayant l'intention d'étudier en détail la précipitation des protéines sériques par le molybdate d'ammonium dans des conditions variées, nous avons ressenti la nécessité de mettre en jeu une technique permettant le dosage rapide, mais néanmoins suffisamment précis, des protéines sériques. Après un certain nombre d'essais préliminaires, nous avons choisi la méthode que Machebœuf, Lacaille et Rebeyrotte [69] ont mise au point aussi bien pour les protéines sériques totales que pour les diverses fractions protéidiques et qui utilise la réaction xanthoprotéique. Le principe de la technique consiste à traiter à chaud la solution protéidique par une solution aqueuse d'acide nitrique puis par de l'ammoniaque. Pratiquement, on utilise 2 cm^3 d'une solution de protéines contenant de 100 à 1.000 γ de protéines par cm^3, à laquelle on ajoute 2 cm^3 de solution d'acide nitrique (à 225 cm^3 à 40° B par litre). On place ce mélange vingt-cinq minutes dans un bain-marie bouillant; on laisse ensuite refroidir pendant dix minutes et l'on ajoute 3 cm^3 d'ammoniaque à 22° B. Après un quart d'heure, on peut effectuer la lecture de l'intensité de la coloration à l'électrophotomètre de Meunier en utilisant l'écran n° 43. La première opération pour le dosage consiste à établir une courbe étalon grâce à la mise en œuvre de solutions protéidiques de titre croissant et connu. On effectue également un témoin dans lequel la solution protéidique est remplacée par de l'eau physiologique; le chiffre donné par l'appareil de Meunier pour ce témoin est déduit des autres chiffres obtenus.

TABLEAU I

Teneur en protéines de l'échantillon (γ)	Unités Meunier
200	13
400	26
600	40
800	54
1.000	67
1.200	84
1.400	94
1.600	107
1.800	121
2.000	132

Le tableau I rend compte des résultats que nous avons obtenus; la courbe correspondante (n° 5) servira dans toutes les expériences pour déduire, des chiffres trouvés à l'électrophotomètre de Meunier, la teneur en protéines des solutions mises en jeu.

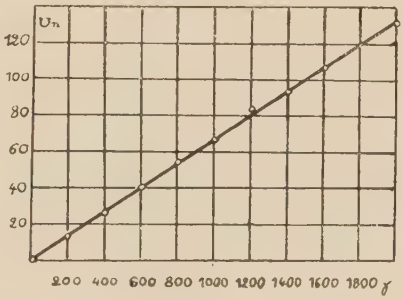

Fig. 5.

Courbe représentative des variations de l'intensité de la coloration (en unités Meunier, témoin déduit) en fonction du poids de protéines mises en jeu (γ).

III. - ÉTUDE QUANTITATIVE CONCERNANT L'ACTION DU MOLYBDATE D'AMMONIUM SUR LE SÉRUM TOTAL DE CHEVAL.

Mme Roche, Samuel et Arthaud [99] ont montré depuis longtemps déjà le rôle joué par la dilution du sérum sur la précipitation des protéines sériques par relargage.

Le travail de ces auteurs nous a donc incité à étudier l'action exercée par le molybdate d'ammonium sur le sérum sanguin à divers taux de dilution.

Voici, à titre indicatif, le mode opératoire que nous avons mis en œuvre pour chaque solution de sérum.

Nous avons préparé 11 échantillons de 2 cm^3 de solution de sérum de Cheval normal; à chacun de ces échantillons, nous avons ajouté des quantités variables de solution de molybdate d'ammonium à 5 p. 100 (*p*H 5,3) ; partout, nous avons complété à un même volume (4 cm^3) avec de l'eau physiologique.

Nous avons recueilli par centrifugation les précipités formés et nous les avons dissous dans 4 cm^3 d'ammoniaque à 5 p. 100. Nous avons prélevé des parties aliquotes de cette solution ammoniacale afin que la lecture soit compatible avec la courbe témoin que nous avons précédemment établie, et, sur ces prélèvements, nous avons effectué le dosage des protéines. Nos essais ont porté sur le sérum entier, le sérum dilué au demi, dilué au quart, dilué au 1/10 et dilué au 1/28.

Dans le tableau II se trouvent réunis les résultats que nous avons obtenus dans les diverses expériences. Ces résultats ont été ramenés dans tous les cas à 1 cm^3 de solution de sérum, plus ou moins dilué, traité.

Ce tableau donne des valeurs absolues, mais, ce qui importe, c'est surtout de connaître le pourcentage de protéines totales précipitées dans chaque cas; le tableau III en rend compte.

Au tableau III correspondent les courbes de la figure 6.

L'examen des résultats et des courbes suggère diverses remarques :

1° Toutes proportions gardées, le poids de protéines précipitées d'un sérum par le molybdate d'ammonium se montre d'autant plus élevé que la dilution est plus grande; les chiffres qui indiquent le pourcentage maximum des protéines précipitées par le molybdate en rendent compte (tableaux II et III).

TABLEAU II

Volume (cm^3) de solution de molybdate d'ammonium à 5 p. 100 ajouté à 1 cm^3 de solution protéidique.	Sérum entier (mg)	Sérum au 1/2 (mg)	Sérum au 1/4 (mg)	Sérum au 1/10 (mg)	Sérum au 1/28 (mg)
0	0	0	0	0	0
0,05	0,31	0,17	0,12	0,26	1,07
0,10	0,59	0,36	0,54	1,33	1,14
0,20	0,87	1,13	1,24	1,49	0,87
0,30	»	»	»	»	0,69
0,40	1,79	1,71	1,65	1,04	0,53
0,50	1,91	1,59	1,59	0,67	0,46
0,60	2,01	1,47	1,26	0,60	0,32
0,70	2,05	1,44	1,17	0,49	0,28
0,80	1,97	1,28	1,05	0,43	0,23
0,90	1,75	1,25	0,85	0,31	0,15
0,95	1,55	1,10	0,76	0,26	»
1,00	1,52	1,04	0,70	0,24	»
1,25	0,89	0,66	0,33	0,15	»

Comment peut-on expliquer cette action exercée par la dilution sur le phénomène ?

Divers auteurs, et en particulier M^me^ Roche et ses collaborateurs [98, 99], ont insisté sur le rôle joué par la dilution dans la précipitation des protéines par les sels. En milieu concentré, il se produit des associations entre les globulines et les albumines; il n'en est plus de même en milieu dilué. Or, nous avons constaté que le molybdate n'exerce aucune action sur la précipitation des albumines sériques; bien plus, la présence d'albumines dans une solution de globulines diminue le pouvoir précipitant du molybdate d'ammonium vis-à-vis de cette dernière fraction (voir p. 58); enfin, le pouvoir inhibiteur exercé par les albumines se montre d'autant plus marqué que le

TABLEAU III

Volume (cm^3) de solution de molybdate d'ammonium à 5 p. 100 ajouté à 1 cm^3 de solution protéidique.	p. 100 des protéines précipitées.				
	Sérum entier	Sérum au 1/2	Sérum au 1/4	Sérum au 1/10	Sérum au 1/28
0	0	0	0	0	0
0,05	0,4	0,5	0,7	3,7	42,8
0,10	0,8	1,0	3,1	19,0	45,2
0,20	1,2	3,2	7,1	21,3	34,8
0,30	»	»	»	»	27,6
0,40	2,5	4,9	9,4	14,8	21,2
0,50	2,7	4,5	9,1	9,6	18,4
0,60	2,9	4,2	7,2	8,6	12,8
0,70	2,9	4,1	6,7	7,0	11,2
0,80	2,8	3,6	6,0	6,1	9,2
0,90	2,5	3,6	4,9	4,4	6,0
0,95	2,2	3,1	4,4	3,7	»
1,00	2,2	3,0	4,0	3,4	»
1,25	1,3	1,9	1,9	2,1	»

milieu est plus concentré en protéines (voir p. 59). Il semble donc que c'est à la présence de la fraction sérum-albumines que doit être rattaché le rôle joué par la dilution sur la précipitation des protéines sériques par le molybdate d'ammonium. Si donc on veut obtenir le maximum de protéines précipitées, lorsqu'on met en œuvre le molybdate d'ammonium, il convient de diluer le milieu.

Jusqu'à quel taux la dilution doit-elle être effectuée ?

Il est facile d'en avoir une idée. Si, en effet, on trace la courbe représentative des variations du pourcentage de protéines précipitées en fonction du taux de dilution du sérum, on obtient une courbe que l'on peut extrapoler et qui rend compte de la dilution minimum permettant de

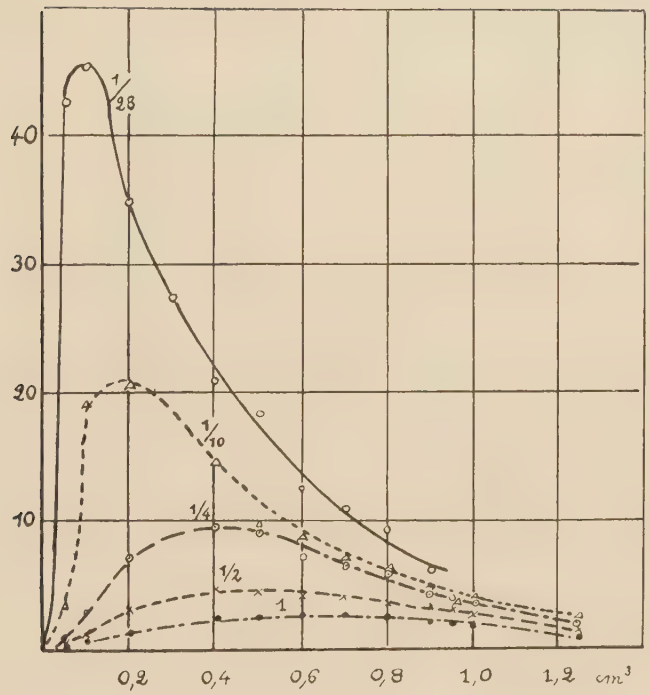

FIG. 6.

Courbes représentatives des variations du pourcentage de protéines précipitées du sérum de Cheval plus ou moins dilué en fonction du volume de solution de molybdate d'ammonium ajouté à la solution protéidique.

précipiter le maximum de protéines. Malheureusement, cette extrapolation n'est pas réalisable avec l'ensemble des courbes que nous avons tracées, car la dilution au 1/28, la plus élevée que nous ayons utilisée, est encore trop faible pour nous permettre de conclure.

Nous avons donc réalisé une nouvelle série d'expériences avec un autre sérum de Cheval.

Le tableau IV rend compte de nos résultats bruts et le tableau V indique le pourcentage de protéines précipitées. A ce dernier tableau correspondent les courbes de la figure 7.

TABLEAU IV

Volume (cm^3) de solution de molybdate d'ammonium à 5 p. 100 ajouté à 1 cm^3 de solution protéidique.	Sérum au 1/10 (mg)	Sérum au 1/20 (mg)	Sérum au 1/40 (mg)	Sérum au 1/60 (mg)	Sérum au 1/100 (mg)
0	0	0	0	0	0
0,025	0	0,68	0,98	0,90	0,62
0,05	0,86	1,72	1,52	0,95	0,61
0,1	1,88	2,00	1,36	0,93	0,61
0,2	2,10	1,50	1,12	0,72	0,55
0,3	1,84	1,32	0,96	0,60	0,46
0,4	1,64	1,04	0,76	0,44	0,31
0,5	1,36	0,80	0,64	0,38	0,26
0,6	1,05	0,68	0,40	0,23	0,16
0,7	0,60	0,58	0,42	0,20	0,13
0,8	0,60	0,51	0,40	0,18	0,09
0,9	0,56	0,42	0,40	0,15	0,07
1,0	0,39	0,24	0,30	0,09	0,07

TABLEAU V

Volume (cm^3) de solution de molybdate d'ammonium à 5 p. 100 ajouté à 1 cm^3 de solution protéidique.	p. 100 des protéines précipitées.				
	Sérum au 1/10	Sérum au 1/20	Sérum au 1/40	Sérum au 1/60	Sérum au 1/100
0	0	0	0	0	0
0,025	0	16	44	66	80
0,05	10	42	69	70	78
0,1	22	47	61	68	78
0,2	25	37	51	53	71
0,3	21	32	43	44	59
0,4	19	25	34	32	40
0,5	16	19	29	28	34
0,6	13	16	18	17	21
0,7	7,5	13	19	15	17
0,8	7,5	12	18	13	12
0,9	7	10	18	11	9
1,0	5	5	13	7	9

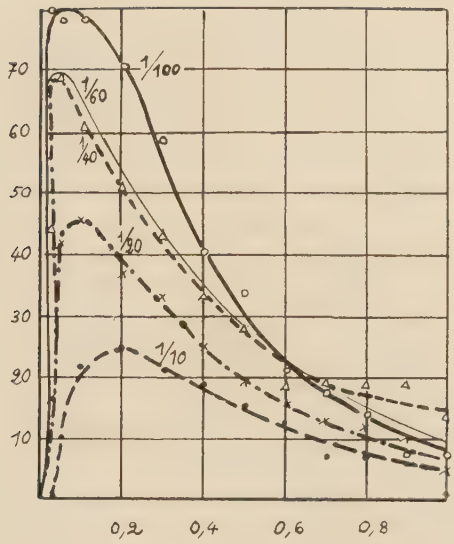

Fig. 7.

Courbes représentatives des variations du pourcentage de protéines précipitées du sérum de Cheval plus ou moins dilué en fonction du volume de solution de molybdate d'ammonium ajouté à la solution protéidique.

Si maintenant on trace la courbe représentative des variations du pourcentage maximum de protéines précipitées dans chaque cas en fonction du taux de dilution (tableau VI et courbe de la figure 8), on constate que le taux de dilution minimum permettant d'obtenir le maximum de précipitation est de l'ordre du 1/80e.

2° Il est très curieux de constater que nos courbes présentent un maximum : il est rare, en effet, lorsqu'on étudie la précipitation d'une solution protéidique en fonction de la concentration saline, d'observer à partir d'une certaine concentration en sel une redissolution des protéines.

Cette constatation, qui fait actuellement l'objet de recherches dans le laboratoire où nous travaillons (Mar-

TABLEAU VI

Taux de dilution	Pourcentage maximum de protéines précipitées.
1/10°	25
1/20°	47
1/40°	69
1/60°	70
1/100°	80

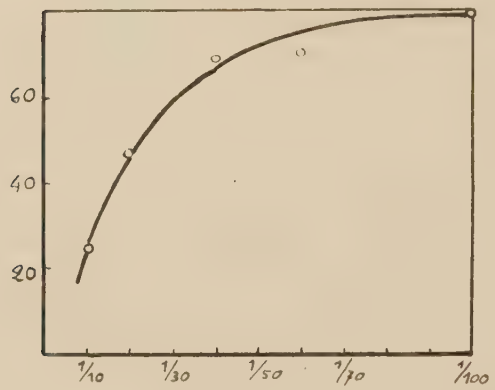

Fig. 8.

Courbe représentative des variations du pourcentage maximum de protéines précipitées en fonction du taux de dilution du sérum.

quevielle [80]), doit être rattachée au *p*H du milieu. L'addition au sérum ou aux fractions protéidiques d'une quantité déterminée de solution de molybdate provoque une chute du *p*H, comme si, les protéines s'étant emparées de l'ion ammonium, de l'acide molybdique se trouvait mis en liberté. En présence d'un excès de molybdate, le *p*H du milieu tend vers celui de la solution de ce sel. On constate que la précipitation maximum correspond toujours à la

zone voisine du *p*H le plus bas. En réalité, c'est l'échantillon voisin du *p*H le plus bas qui offre généralement le précipité le plus abondant. Cela montre que l'influence jouée par le sel lui-même n'est pas négligeable.

Le *p*H — nous aurons l'occasion de le démontrer — joue un rôle essentiel dans la précipitation des protéines sériques par le molybdate d'ammonium.

3° Le maximum de précipité obtenu dans chaque cas correspond à des quantités de molybdate variables.

Cette constatation montre la différence qui existe entre le molybdate et d'autres réactifs utilisés pour la précipitation des protéines sériques, comme le sulfate d'ammonium, par exemple; avec ce dernier sel les globulines précipitent à demi-saturation et cela quelle que soit la concentration du milieu en protéines, jusqu'à une certaine valeur toutefois.

Cette propriété particulière doit être rattachée à la formation d'un complexe protéines-molybdate d'ammonium : lorsque le milieu est pauvre en protéines, le *p*H minimum et le précipité le plus abondant apparaissent pour une faible concentration en molybdate; l'inverse se produit avec des concentrations en protéines plus élevées.

IV. — ÉTUDE QUANTITATIVE CONCERNANT L'ACTION DU MOLYBDATE D'AMMONIUM SUR LES EUGLOBULINES DU SÉRUM DE CHEVAL.

Pour cette étude, nous avons utilisé le même mode opératoire que celui précédemment décrit. Dans une première série d'expériences, nous avons mis en œuvre une solution d'euglobulines préparée selon la technique exposée dans le chapitre précédent et contenant 10 p. 1.000 de protéines.

Dans le tableau VII se trouvent réunis les résultats que nous avons obtenus.

TABLEAU VII

Volume (cm^3) de solution de molybdate d'ammonium à 4 p. 100 ajouté à 1 cm^3 de solution d'euglobulines.	Solution à 10 p. 1.000		Solution à 2,64 p. 1.000	
	Protéines précipitées (mg) par cm^3	p. 100 de protéines précipitées	Protéines précipitées (mg) par cm^3	p. 100 de protéines précipitées
0	0	0	»	»
0,005	0,49	4,9	»	»
0,010	3,15	31,5	»	»
0,015	6,40	64,0	»	»
0,020	7,52	75,2	»	»
0,025	7,62	76,2	2,42	91
0,05	8,55	85,5	2,46	93
0,10	9,02	90,2	2,44	92
0,15	8,80	88,0	»	»
0,20	8,42	84,2	2,41	91
0,25	8,31	83,1	»	»
0,30	»	»	2,33	88
0,40	»	»	2,15	81
0,50	7,38	73,8	2,08	78
0,60	»	»	2,05	77
0,70	»	»	1,80	68
0,75	5,90	59,0	»	»
0,80	»	»	1,74	65
0,90	»	»	1,59	60
1,00	»	»	1,47	55

Nous avons effectué une nouvelle expérience, mais cette fois nous avons utilisé une solution d'euglobulines à 2,64 p. 1.000 (*).

Nos résultats ramenés à 1 cm^3 de solution traitée se

(*) Le chiffre 2,64 a été choisi parce que, au cours de la préparation de nos premières solutions, il correspondait au titre de la préparation la plus diluée.

trouvent également dans le tableau VII. Dans ce même tableau, nous avons encore indiqué le pourcentage des protéines précipitées. A ce tableau correspondent les courbes de la figure 9.

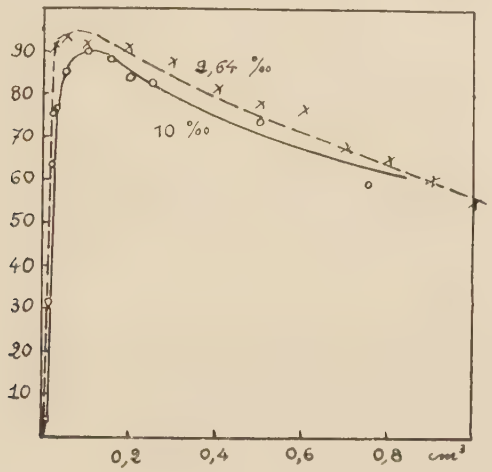

Fig. 9.

Courbes représentatives des variations du pourcentage d'euglobulines précipitées en fonction du volume de solution de molybdate d'ammonium à 4 p. 100 ajouté à la solution.

Ces courbes suggèrent des remarques du même type que celles précédemment exposées pour le sérum total. La présence d'un maximum s'explique également ici par les variations de *p*H du milieu. Le déplacement du maximum en fonction de la dilution de la solution est dû, ici encore, à l'effet exercé par la concentration en protéines sur les modifications du *p*H.

Il est en outre très intéressant de remarquer que la dilution de la solution n'intervient pratiquement plus sur le pourcentage maximum de protéines précipitées. Nous avons affaire ici à une solution d'euglobulines ne contenant pas d'albumines. Cette constatation apporte un argu-

ment sérieux en faveur de l'explication que nous avons précédemment donnée pour le sérum total.

Enfin, il est intéressant de noter que le molybdate d'ammonium à une concentration donnée (qui varie avec la concentration en protéines de la solution) précipite la quasi-totalité des euglobulines du sérum sanguin, à condition que celles-ci ne se trouvent pas en présence des autres fractions protéidiques du sérum.

V. — ÉTUDE QUANTITATIVE CONCERNANT L'ACTION DU MOLYBDATE D'AMMONIUM SUR LES PSEUDOGLOBULINES DU SÉRUM DE CHEVAL.

Cette fois encore, nous avons mis en œuvre le même mode opératoire et nous avons utilisé des solutions de pseudoglobulines de sérum de Cheval préparées suivant la technique de Marcus [79]. Dans le tableau VIII se trouvent les résultats que nous avons obtenus avec des solutions à deux concentrations différentes (10 et 2,64 p. 1.000).

Nous avons indiqué également le pourcentage de protéines précipitées dans chaque cas.

Au tableau VIII correspondent les courbes de la fig. 10.

L'examen du tableau et des courbes montre de nouveau que la dilution de la solution constitue un facteur essentiel dans la précipitation des protéines sériques par le molybdate d'ammonium. Ici encore, et pour les mêmes raisons que précédemment, la concentration en molybdate permettant la précipitation des pseudoglobulines varie avec la dilution du milieu. Il est néanmoins intéressant de noter que, dans le cas des pseudoglobulines, le pourcentage de protéines précipitées varie d'une manière sensible avec la concentration de la solution de pseudoglobulines mise en jeu. Ceci s'explique très bien lorsque l'on considère que les globulines préparées suivant la technique d'Hofmeister [44] contiennent des albumines ainsi que l'ont montré Mac Farlane [62], Hewitt [43], Pérez [89], et

TABLEAU VIII

Volume (cm^3) de solution de molybdate d'ammonium à 4 p. 100 ajouté à 1 cm^3 de solution de pseudoglobulines.	Solution à 10 p. 1.000		Solution à 2,64 p. 1.000	
	Protéines précipitées (mg) par cm^3	p. 100 de protéines précipitées	Protéines précipitées (mg) par cm^3	p. 100 de protéines précipitées
0	0	0	0	0
0,025	1,80	18,0	2,12	80,3
0,05	6,12	61,2	2,33	88,2
0,10	7,40	74,0	2,35	89,0
0,20	7,32	73,2	1,95	73,8
0,30	6,76	67,6	1,66	62,8
0,40	6,44	64,4	1,34	50,7
0,50	6,00	60,0	1,00	37,8
0,60	6,00	60,0	0,88	33,3
0,70	5,07	50,7	0,56	21,2
0,80	4,71	47,1	0,47	17,8
0,90	4,10	41,0	0,29	10,9
1,00	3,82	38,2	0,27	10,2

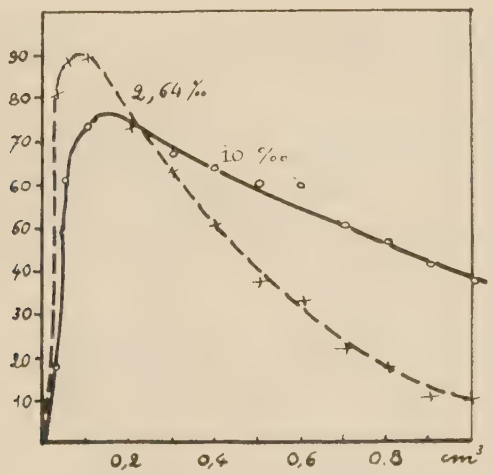

FIG. 10.

Courbes représentatives des variations du pourcentage de pseudoglobulines précipitées en fonction du volume de solution de molybdate d'ammonium à 4 p. 100 ajouté à la solution.

Tayeau et Martin [118]. Ces albumines viennent d'ailleurs souiller presque exclusivement la fraction pseudoglobulines (Tayeau et Florentin - Martin [117]).

Il se forme alors des associations pseudoglobulines-albumines d'autant plus sensibles que la solution est plus concentrée.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE III

Nous avons étudié la précipitation des protéines sériques par le molybdate d'ammonium. Nous avons montré que ce sel précipite une partie des protéines du sérum sanguin et qu'il existe une concentration optimum en sel permettant une précipitation maximum.

Nous avons expliqué cette précipitation maximum en montrant l'existence d'une combinaison protéines-molybdate apportant des modifications au *p*H du milieu. Nous avons porté ensuite notre attention sur les différentes fractions protéidiques du sérum.

— Les euglobulines préparées selon Marcus sont pratiquement précipitées complètement par le molybdate d'ammonium.

— Les pseudoglobulines ne sont que partiellement précipitées.

— Les albumines ne le sont pas du tout.

Nous avons insisté sur le rôle particulier joué par la concentration de la solution protéidique mise en jeu dans l'effet précipitant exercé par le molybdate d'ammonium.

CHAPITRE IV

LA PRÉCIPITATION DES PROTÉINES SÉRIQUES PAR LE MOLYBDATE D'AMMONIUM EN FONCTION DU *p*H

Nous avons insisté dans le chapitre précédent sur la forme inattendue présentée par les courbes de précipitation des protéines sériques sous l'influence du molybdate d'ammonium : ces courbes présentent un maximum très net alors que rien de semblable ne se produit avec les sels habituellement utilisés pour le fractionnement des protéines sériques.

Nous avons montré que cette constatation devait être rattachée aux variations de *p*H du milieu sous l'influence du molybdate. Le *p*H constitue donc un facteur essentiel; aussi, avons-nous porté notre attention sur l'effet produit par le *p*H du milieu sur la précipitation des protéines sériques par le molybdate d'ammonium.

I. — ÉTUDE EN MILIEU DILUÉ

Nos essais ont porté sur les fractions euglobulines, pseudoglobulines et albumines, enfin sur le sérum total.

A. — Essais sur les euglobulines

La fraction euglobulines a été préparée comme dans les précédentes expériences selon la technique de Marcus. La

solution mise en œuvre présentait une concentration en protéines de 4 p. 1.000. Cette solution a été divisée en 12 échantillons auxquels nous avons ajouté du molybdate d'ammonium (0,25 cm³ de solution de molybdate d'ammonium à 4 p. 100 par centimètre cube de solution d'euglobulines), puis des quantités variables d'acide chlorhydrique 0,1 N (*). Partout, nous avons complété au même volume avec de l'eau physiologique; après mélange, nous avons soumis nos échantillons à la centrifugation. Les protéines des précipités formés étaient dosées, tandis que les eaux-mères servaient à effectuer la mesure électrométrique du *p*H.

Le tableau IX rend compte des résultats que nous avons obtenus dans cet essai (correspondant à 1 cm³ de solution

TABLEAU IX

ClH 0,1 N ajouté à 1 cm³ de solution (cm³)	Euglobulines		Pseudo-globulines		Albumines		Sérum	
	*p*H	Protéines précipitées (mg)	*p*H	Protéines précipitées (mg)	*p*H	Protéines précipitées (mg)	*p*H	Protéines précipitées (mg)
0	6,85	0	6,52	0	7,03	0	6,91	0
0,1	5,55	1,35	5,64	0,05	5,54	0	5,72	0,04
0,2	5,44	1,51	5,57	0,18	5,44	0	5,56	0,13
0,3	5,33	1,75	5,45	0,39	5,34	0	5,45	0,26
0,4	5,22	2,20	5,36	0,81	5,24	0	5,43	0,30
0,5	5,07	2,85	5,18	1,60	5,10	0,04	5,22	0,34
0,6	4,92	3,46	5,03	2,54	5,00	0,09	5,11	0,98
0,7	4,68	4,02	4,77	3,85	4,83	1,57	4,88	3,36
0,8	4,23	4,10	4,31	4,02	4,57	4,15	4,79	3,60
0,9	3,34	4,10	3,53	4,10	4,19	4,00	4,11	4,00
1,0	2,50	4,00	2,55	4,05	3,21	3,84	3,53	3,92

(*) Nos essais concernant l'action du *p*H ont mis en jeu l'acide chlorhydrique et non des solutions tampon de *p*H connu. Nous avons dû renoncer à étudier ces derniers, car les sels qu'ils contiennent amènent, en présence du molybdate, une redissolution des précipités protéidiques.

traitée). A ce tableau correspondent les courbes de la figure 11.

Il importe de noter que la solution de molybdate que nous avons utilisée a été neutralisée avant l'emploi. Son *p*H était de 7,1, ceci afin de couvrir une large gamme de *p*H.

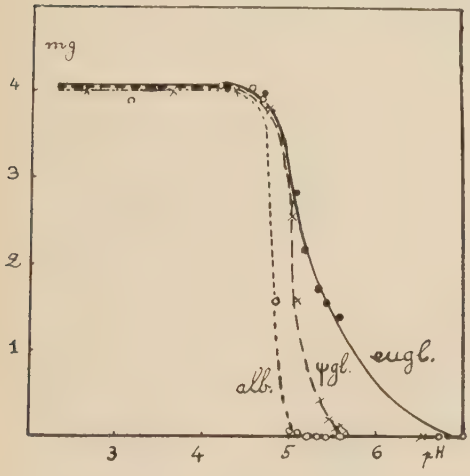

Fig. 11.

Courbes représentatives des variations du poids de protéines précipitées par le molybdate d'ammonium en fonction du *p*H.

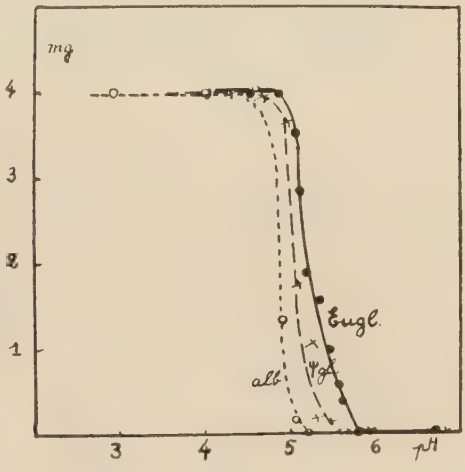

Fig. 12.

Courbes représentatives des variations du poids de protéines précipitées par le molybdate d'ammonium en fonction du *p*H.

Nous avons ensuite effectué une expérience identique à la précédente, mais cette fois nous avons précisé certains points du début de la courbe. Les résultats obtenus dans cette deuxième expérience se trouvent consignés dans le tableau X auquel correspondent les courbes de la fig. 12.

B. — Essais sur les pseudoglobulines

L'expérience sur les pseudoglobulines a été réalisée en tous points comme la précédente. Les tableaux IX et X, auxquels correspondent les courbes des figures 11 et 12, indiquent les résultats que nous avons obtenus.

C. — Essais sur les albumines

La solution des albumines a été obtenue suivant la technique d'Hofmeister [44]. Elle a été amenée au même titre en protéines que les deux autres solutions (4 p. 1.000) avant d'être traitée d'une façon identique. Les résultats obtenus dans les deux expériences se trouvent consignés dans les tableaux IX et X auxquels correspondent les courbes des figures 11 et 12.

D. — Essais sur le sérum total

Après avoir effectué le dosage des protéines, le sérum a été dilué de telle façon que sa concentration en protéines

TABLEAU X

ClH 0,1 N ajouté à 1 cm³ de solution (cm³)	Euglobulines		Pseudoglobulines		Albumines	
	*p*H	Protéines précipitées (mg)	*p*H	Protéines précipitées (mg)	*p*H	Protéines précipitées (mg)
0	6,70	0	6,92	0	6,98	0
0,025	5,68	0	5,80	0	»	»
0,050	5,56	0,40	5,68	0	»	»
0,075	5,52	0,60	5,61	0	»	»
0,10	5,49	1,00	5,58	0,03	»	»
0,20	5,37	1,60	5,48	0,17	»	»
0,30	5,17	1,92	5,36	0,24	»	»
0,40	5,13	2,84	5,25	1,09	»	»
0,50	5,02	3,52	5,13	1,77	5,18	0
0,60	4,81	4,00	4,93	3,72	5,01	0,27
0,70	4,50	3,94	4,67	4,05	4,85	1,35
0,80	»	»	4,33	4,10	4,56	4,10
0,90	»	»	»	»	3,99	4,22
1,00	»	»	»	»	2,93	4,22

soit également de 4 p. 1.000. Le même mode opératoire a été appliqué.

Les résultats que nous avons obtenus se trouvent rassemblés dans le tableau IX.

L'examen des résultats et des courbes permet d'émettre diverses remarques.

En ajoutant une solution de molybdate d'ammonium au sérum sanguin ou à des solutions de fractions protéidiques du sérum (solution de molybdate d'ammonium à 4 p. 100, sérum ou solution protéidique présentant une concentration en protéines de 4 p. 1.000), on peut, en amenant le milieu à un *p*H déterminé, obtenir la précipitation totale des protéines contenues dans la solution traitée. On constate, en effet, que la solution entraîne 4 mg de protéines par centimètre cube et que, dans tous les cas, la totalité de ces substances a pu être précipitée (*).

Le *p*H optimum de précipitation varie avec la nature des protéines mises en œuvre. Voici la valeur du *p*H pour les diverses solutions étudiées :

Euglobulines	4,8
Pseudoglobulines	4,6
Albumines	4,5
Sérum total	4,4

Ce *p*H est donc situé d'autant plus bas, lorsque l'on considère les fractions protéidiques, que l'effet précipitant exercé par le molybdate d'ammonium se fait le moins sentir et que le *p*H isoélectrique de la fraction est lui-même plus bas.

Cette constatation présente un double intérêt : elle montre que le molybdate d'ammonium se conduit vis-à-vis des protéines sériques comme la plupart des sels utilisés pour leur fractionnement; si, en effet, on ajoute au sérum

(*) On notera que, dans certains cas, le chiffre de 4 mg a été très légèrement dépassé; cela est dû à l'erreur relative de la technique colorimétrique mise en jeu.

une petite quantité de sulfate d'ammonium et que l'on trace la courbe de précipitation des protéines en fonction du *p*H, on constate que, pour obtenir le maximum de protéines précipitées, il faut se placer à un *p*H d'autant plus acide que la fraction envisagée présente un point isoélectrique plus bas. Cette observation apporte un argument en faveur des faits que nous avons constatés dans le chapitre précédent. Nous avons insisté sur l'aspect imprévu présenté par la courbe de précipitation des protéines sériques en fonction de la concentration du milieu en molybdate. Cette courbe, en effet, présentait un maximum net. Or, nous avons montré que ce maximum devait être rattaché aux variations de *p*H du milieu apportées par la réaction entre les protéines et le molybdate. Dans les expériences que nous venons de décrire, dans lesquelles le *p*H a été spécialement étudié, nous constatons que le molybdate se conduit cette fois comme les divers sels habituellement utilisés dans le fractionnement des protéines sériques.

II. — ÉTUDE DU PHÉNOMÈNE EN MILIEU PLUS CONCENTRÉ

Les résultats que nous venons d'exposer ne sont valables que pour des concentrations données en protéines et en molybdate d'ammonium. Si l'on fait varier les concentrations relatives de ces substances, les courbes, tout en présentant un même aspect, correspondent à des valeurs parfois très différentes : lorsque les concentrations en molybdate et en protéines atteignent des taux plus élevés, les diverses courbes correspondant aux trois grandes fractions protéidiques arrivent même parfois à se confondre.

Nous avons tracé un certain nombre de courbes, estimant qu'elles peuvent être susceptibles d'apporter des renseignements d'ordre technique sur la précipitation totale des diverses protéines sériques par le molybdate d'ammonium.

A. — Essais sur les euglobulines

Avec des euglobulines, toujours préparées suivant la technique de Marcus, nous avons mis en jeu une solution de ces protéines à 2 p. 100 que nous avons traitée par des quantités variées de molybdate d'ammonium (solution à 10 p. 100). Nous avons étudié alors l'effet exercé sur ce mélange par le *p*H du milieu.

Notons que, dans cette nouvelle série d'essais, la solution de molybdate d'ammonium a été utilisée telle quelle sans neutralisation préalable. Son *p*H est donc voisin de 5,4. Le tableau XI rend compte de nos résultats ramenés à 1 cm³ de solution traitée.

TABLEAU XI

*p*H	Solut. de molybdate : 0,025 par cm³. Protéines précipitées (mg).	*p*H	Solut. de molybdate : 0,05 par cm³. Protéines précipitées (mg).
6,6	0,52	6,2	5,56
6,0	5,67	5,9	12,07
5,8	13,12	5,8	16,27
5,6	16,27	5,6	17,30
5,4	17,85	5,5	18,35
5,0	19,80	5,2	19,80
4,1	19,80	4,4	19,80
*p*H	Solut. de molybdate : 0,125 par cm³. Protéines précipitées (mg).	*p*H	Solut. de molybdate : 0,25 par cm³. Protéines précipitées (mg).
5,8	13,61	6,1	6,82
5,7	14,17	5,9	7,34
5,65	16,27	5,7	10,71
5,6	16,80	5,65	13,96
5,5	19,30	5,6	17,52
5,4	19,81	5,5	18,35
4,9	19,80	5,1	19,80

B. — Essais sur les pseudoglobulines

Avec les pseudoglobulines, nous avons effectué également une série d'essais mettant en jeu une solution à 2 p. 100 comme précédemment.

Nos résultats se trouvent réunis dans le tableau XII.

C. — Essais sur les albumines

Avec la solution des albumines, nous avons effectué une expérience du même type en utilisant toujours une solution de molybdate d'ammonium à 10 p. 100.

Nos résultats se trouvent consignés dans le tableau XIII.

Nos expériences permettent d'émettre quelques considérations supplémentaires.

Nous constatons, une fois encore, que la précipitation maximum est obtenue à un *p*H plus acide avec les albumines qu'avec les fractions globuliniques. Cependant, le phénomène est moins net que dans le cas précédent en raison des concentrations en protéines et en molybdate mises en jeu.

Nous constatons également que, plus la concentration en molybdate du milieu est élevée, plus le *p*H optimum de précipitation est également élevé.

Il est un fait cependant qui nous semble intéressant : le début de la précipitation apparaît pour un *p*H plus élevé aux faibles concentrations en molybdate, qu'aux plus fortes concentrations. Si l'on examine, par exemple, le tableau XIII, on constate que le début de précipitation apparaît à *p*H 5,5 lorsqu'on a ajouté 0,05 cm^3 de solution de molybdate à 10 p. 100 par cm^3 de solution protéidique, tandis qu'avec 0,75 cm^3 de solution de molybdate, la précipitation ne commence à apparaître qu'en dessous de *p*H 5,2. Ce fait, qui est apparu dans toutes nos expériences, laisse supposer également la formation de complexes entre le molybdate et les protéines.

TABLEAU XII

*p*H	Solut. de molybdate : 0,025 par cm³. Protéines précipitées (mg).	*p*H	Solut. de molybdate : 0,05 par cm³. Protéines précipitées (mg).
6,2	0	6,0	0
5,7	0,84	5,9	0,84
5,65	5,25	5,8	8,61
5,6	11,02	5,6	16,17
5,4	16,27	5,3	19,30
5,2	19,30	5,0	19,80
4,95	19,80	4,2	19,80

*p*H	Solut. de molybdate : 0,125 par cm³. Protéines précipitées (mg).	*p*H	Solut. de molybdate : 0,25 par cm³. Protéines précipitées (mg).
6,0	1,47	5,8	1,05
5,8	9,45	5,75	2,62
5,7	15,75	5,7	4,72
5,6	17,32	5,6	7,87
5,3	19,30	5,4	14,70
5,0	19,80	5,2	19,30
4,0	19,80	4,8	19,80

*p*H	Solut. de molybdate : 0,50 par cm³. Protéines précipitées (mg).	*p*H	Solut. de molybdate : 0,75 par cm³. Protéines précipitées (mg).
5,85	0	6,1	0
5,8	0,21	5,8	0
5,7	1,57	5,6	0,21
5,6	3,67	5,45	4,83
5,5	10,70	5,20	14,07
5,2	19,60	5,0	19,50
4,8	19,80	4,8	19,80

TABLEAU XIII

*p*H	Solut. de molybdate : 0,025 par cm³. Protéines précipitées (mg).	*p*H	Solut. de molybdate : 0,05 par cm³. Protéines précipitées (mg).
5,6	0	5,6	0
5,4	0,08	5,5	4,20
5,2	12,10	5,4	15,22
4,0	0,36	5,3	17,11
3,5	0,05	3,0	3,78
2,7	0	2,2	1,36

*p*H	Solut. de molybdate : 0,125 par cm³. Protéines précipitées (mg).	*p*H	Solut. de molybdate : 0,25 par cm³. Protéines précipitées (mg).
5,6	0	5,6	0
5,1	16,2	5,6	0
4,0	19,2	5,1	19,8
2,7	19,8	4,9	19,8
2,2	19,8	3,8	19,8
1,8	19,8	2,8	19,8

*p*H	Solut. de molybdate : 0,50 par cm³. Protéines précipitées (mg).	*p*H	Solut. de molybdate : 0,75 par cm³. Protéines précipitées (mg).
5,6	0	5,6	0
5,6	0	5,4	0
5,2	12,6	5,2	0
5,1	16,8	5,0	14,7
4,7	19,8	4,6	19,8
4,2	19,9	4,5	19,8

CONCLUSIONS DU CHAPITRE IV

Nous avons étudié dans ce chapitre la précipitation des diverses protéines sériques par le molybdate d'ammonium en fonction du *p*H.

Nous avons noté qu'en abaissant suffisamment le *p*H d'une solution protéidique traitée par le molybdate d'ammonium, on peut obtenir la précipitation totale des protéines sériques.

Le *p*H de précipitation varie avec la fraction mise en œuvre et avec la concentration de la solution en protéines et en molybdate.

Nous discutons les phénomènes observés.

CHAPITRE V

INFLUENCE JOUÉE PAR LES PROPORTIONS RESPECTIVES DES DIVERSES FRACTIONS PROTÉIDIQUES DU SÉRUM SUR LE POUVOIR PRÉCIPITANT DU MOLYBDATE D'AMMONIUM.

Dans le troisième chapitre, nous avons insisté sur l'influence exercée par la dilution du milieu sur la précipitation des protéines sériques par le molybdate d'ammonium. Nous avons montré, en effet, que, plus le milieu est dilué, plus le pourcentage de protéines précipitées par le molybdate est élevé. Pour expliquer cette constatation, nous avons supposé qu'en milieu concentré particulièrement, il se forme des complexes globulines-albumines. Nous avons donc estimé que les albumines exerçaient un pouvoir inhibiteur vis-à-vis de la précipitation des globulines et plus spécialement des euglobulines par le molybdate d'ammonium. Le but de ce chapitre est de voir si cette hypothèse est bien fondée.

I. — POUVOIR INHIBITEUR DES ALBUMINES

Dans une première série d'expériences, nous avons utilisé une solution d'euglobulines à 1 p. 100 que nous avons répartie en dix échantillons; à chacun de ces échantillons nous avons ajouté des quantités variables de solution de

sérum albumine à 1 p. 100 également. Partout nous avons complété à un même volume avec de l'eau physiologique. Nous avons ajouté alors 0,025 cm³ de solution de molybdate

TABLEAU XIV

Volume (cm³) de solution d'albumines à 1 p. 100 ajouté à 1 cm³ de solution d'euglobulines à 1 p. 100.	Poids (mg) de protéines précipitées par le molybdate.
0	8,14
0,05	7,67
0,15	6,90
0,25	5,63
0,40	3,62
0,50	3,12
0,65	1,57
0,75	1,03
0,85	0,82
1,00	0,72

d'ammonium à 5 p. 100 par cm³ de solution d'euglobulines mise en jeu. Après mélange, nous avons dosé les protéines dans les précipités obtenus.

Le tableau XIV rend compte de nos résultats. A ce tableau correspond la courbe de la figure 13.

Il est bien démontré que, tout au moins aux concentrations auxquelles nous avons opéré, la sérum albumine exerce

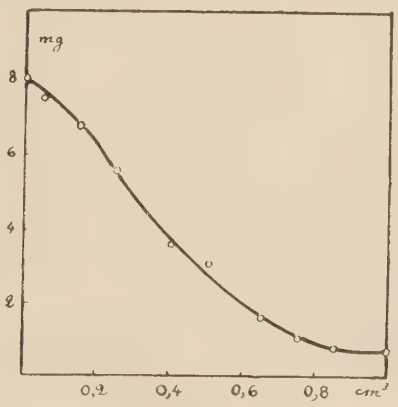

FIG. 13.

Courbe représentative des variations du poids de protéines précipitées en fonction de la concentration du milieu en sérum albumine.

un effet inhibiteur sur la précipitation des euglobulines du sérum.

II. POUVOIR INHIBITEUR DES PSEUDOGLOBULINES

Les pseudoglobulines, nous l'avons vu, ne sont que partiellement précipitées par le molybdate d'ammonium. Il nous a donc semblé intéressant également de voir le rôle joué par les pseudoglobulines sur la précipitation des euglobulines sériques. Nous avons donc effectué un essai comparable au précédent. La solution de sérum albumine a été

TABLEAU XV

Volume (cm³) de solution de pseudoglobulines à à 1 p. 100 ajouté à 1 cm³ de solution d'euglobulines à 1 p. 100.	Poids (mg) de protéines précipitées par le molybdate.
0	5,94
0,05	5,10
0,15	3,80
0,25	3,50
0,40	1,50
0,50	1,44
0,65	1,40
0,75	0,99
0,85	0,95
1,00	0,91

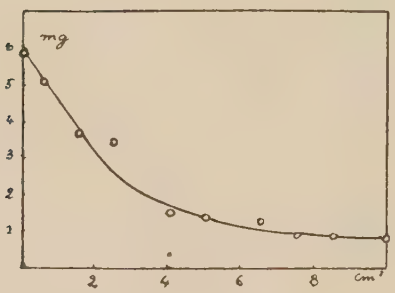

FIG. 14.

Courbes représentatives des variations du poids de protéines précipitées en fonction de la concentration du milieu en pseudoglobulines.

simplement remplacée par une solution de pseudo-globulines. En raison du pouvoir inhibiteur certainement moins grand que celui des albumines, nous avons utilisé la solution de molybdate à 5 p. 100 à la dose de 0,0125 cm^3 par cm^3 de solution d'euglobulines traitée.

Le tableau XV et la courbe de la figure 14 rendent compte de nos résultats.

L'examen du tableau et de la courbe montre que les pseudoglobulines exercent un effet inhibiteur vis-à-vis de la précipitation des euglobulines sériques par le molybdate d'ammonium.

III. — INFLUENCE DU RAPPORT ALBUMINES/GLOBULINES DANS LA PRÉCIPITATION DES GLOBULINES SÉRIQUES PAR LE MOLYBDATE D'AMMONIUM.

Les expériences que nous venons de décrire montrent que la sérum albumine exerce un effet inhibiteur sur la précipitation des globulines par le molybdate. On pouvait donc supposer que la précipitation par le molybdate dépendait du rapport albumines/globulines.

Nous avons cherché à préciser cette notion; pour cela, nous avons préparé des euglobulines, des pseudoglobulines et des albumines, cette fois à partir du sérum humain. Nous avons alors réalisé six mélanges contenant des proportions variables de ces diverses fractions, mais partout la concentration en protéines totales a été la même (80, 4 g par litre). Nous avons ajouté alors, par cm^3 de solution traitée, 0,05 cm^3 de solution de molybdate d'ammonium à 5 p. 100 et nous avons évalué dans tous les cas le poids de protéines précipitées. Le tableau XVI et la courbe de la figure 15 rendent compte de nos résultats.

Ces résultats montrent que la quantité de protéines précipitées du sérum par le molybdate d'ammonium dépend du rapport albumines/globulines.

TABLEAU XVI

Composition de la solution (p. 100)	Rapport albumines/globulines	Protéines précipitées (mg)
Euglobulines ..... 2,02 Pseudoglobulines ... 1,02 Albumines 5,00	1,65	1,4
Euglobulines ..... 2,52 Pseudoglobulines ... 1,02 Albumines 4,50	1,27	1,6
Euglobulines ..... 3,02 Pseudoglobulines ... 1,02 Albumines 4,00	1	1,7
Euglobulines ..... 3,52 Pseudoglobulines ... 1,02 Albumines 3,50	0,77	1,8
Euglobulines ..... 4,00 Pseudoglobulines ... 1,02 Albumines 3,02	0,60	2,1
Euglobulines ..... 4,50 Pseudoglobulines ... 1,02 Albumines 2,52	0,45	2,6

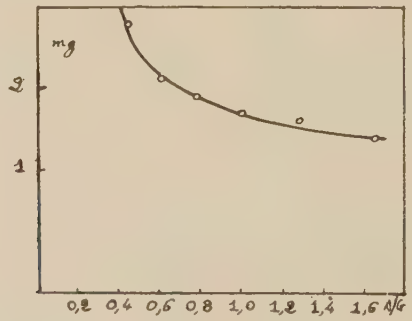

FIG. 15.

Courbe représentative des variations du poids de protéines précipitées en fonction de la valeur du rapport albumines/globulines.

IV. — NATURE ÉLECTROPHORÉTIQUE DES PROTÉINES PRÉCIPITÉES PAR LE MOLYBDATE D'AMMONIUM.

Les expériences décrites dans les précédents chapitres nous ont démontré que les euglobulines du sérum de Cheval étaient quantitativement précipitées par une quantité convenable de molybdate d'ammonium. Or, on sait que chez cet animal les euglobulines sont constituées à peu près exclusivement de γ-globulines.

Il nous a paru intéressant de savoir si, avec le sérum total, les γ-globulines sont spécifiquement précipitées. A cet effet, nous avons étudié le diagramme électrophorétique des protéines sériques de Cheval précipitées par le molybdate d'ammonium.

Pour cette étude, nous avons utilisé l'appareil de Machebœuf et Rebeyrotte, et nous avons réalisé parallèlement le diagramme électrophorétique du sérum total et ceux du précipité obtenu par action :

1° De 10 cm³ de solution de molybdate d'ammonium à 5 p. 100 sur 50 cm³ de sérum de Cheval au dixième;

2° De 37,5 cm³ de solution de molybdate d'ammonium à 5 p. 100 sur 100 cm³ de sérum de Cheval au demi.

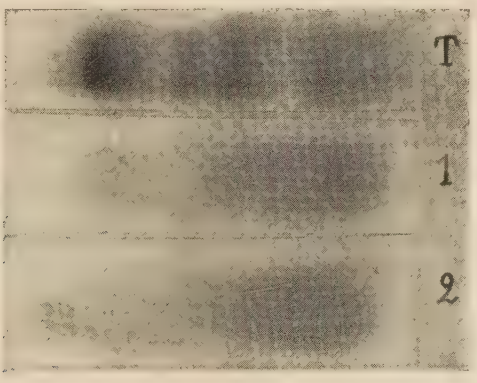

Fig. 16.

L'examen du diagramme (fig. 16) montre que, dans un cas comme dans l'autre, la fraction précipitée par le molybdate contient surtout des γ-globulines, des traces de β-globulines et des traces d'albumines inévitablement entraînées avec les β-globulines.

Cet essai montre que le molybdate d'ammonium amène surtout la précipitation des γ-globulines du sérum de Cheval.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE V

Nous avons montré dans ce chapitre que la fraction pseudoglobulines et surtout la fraction albumines exercent un effet inhibiteur vis-à-vis de la précipitation des euglobulines du sérum sanguin.

Nous avons démontré ensuite que l'abondance de la fraction précipitée par le molybdate dépend de la valeur du rapport albumines/globulines.

Enfin, nous avons mis en évidence la nature électrophorétique des protéines précipitées du sérum de Cheval par le molybdate d'ammonium.

Il s'agit presque exclusivement de γ-globulines, accompagnées de traces de β-globulines et de sérum albumine.

CHAPITRE VI

ROLE DES LIPIDES DANS LA PRÉCIPITATION DES PROTÉINES SÉRIQUES PAR LE MOLYBDATE D'AMMONIUM

On sait que le sérum sanguin, malgré sa limpidité et son homogénéité, contient une très appréciable quantité de lipides (5 à 10 g par litre). Les lipides se trouvent fixés aux protéines et forment les cénapses lipidoprotéidiques (Machebœuf [63]). De nombreuses recherches ont été effectuées sur la nature des liaisons unissant les lipides aux protéines (Machebœuf et Sandor [72], Delage [20], Machebœuf et Tayeau [73], Tayeau [113], etc.).

Ces lipides apportent des modifications parfois notables à la solubilité des protéines auxquelles ils sont fixés. Dans le domaine de la pathologie hépatique, cette constatation prend une grande importance : qu'il nous suffise de rappeler le thymol-test de Mac Lagan qui, après avoir été longtemps positif, redevient négatif chez les cirrhotiques en période pré-mortelle. Cela est dû au fait que les lipides ayant disparu du sang en grande partie, les protéines ont acquis des propriétés de solubilité nouvelles, et le test auparavant positif reprend une valeur normale malgré une aggravation de la maladie (Servantie [108]).

Il était intéressant de savoir si la précipitation des protéines sériques par le molybdate d'ammonium allait être influencée par les lipides du sérum sanguin.

TABLEAU XVII

Volume (cm^3) de solution de molybdate par cm^3 de sérum dilué au 1/10	Série A : protéines précipitées (mg)	Série B : protéines précipitées (mg)
0	0	0
0,025	0,36	0,13
0,05	1,01	0,59
0,10	1,58	1,73
0,15	1,71	1,71
0,20	1,64	1,66
0,25	1,53	1,28
0,50	0,97	0,79
0,75	0,68	0,38
1,00	0,25	0,20
1,25	0,18	0,15

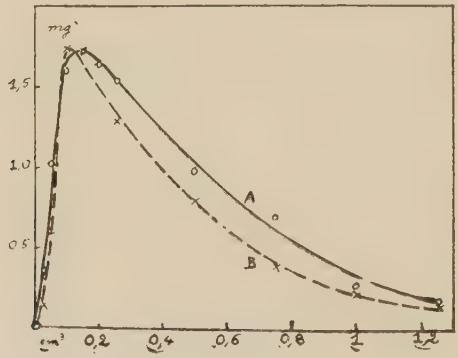

FIG. 17.

Courbes représentatives des variations du poids de protéines précipitées en fonction de la concentration en molybdate d'ammonium.

Courbe A : sérum entier.

Courbe B : sérum délipidé.

Nous avons donc comparé la précipitation des protéines du sérum de Cheval par le molybdate d'ammonium et celle des protéines du même sérum préalablement délipidé. La délipidation du sérum a été réalisée par la technique de Saias [102], la méthode classique de Hardy et Gardiner [41] ne pouvant pas convenir lorsque le dosage des protéines est effectué, selon Machebœuf, Lacaille et Rebeyrotte [69] : ces auteurs ont montré, en effet, l'influence jouée par l'alcool mis en jeu dans la méthode de Hardy et Gardiner sur la réaction xanthoprotéique. La technique de Saias qui utilise l'acétone et l'éther convient très bien pour nos essais.

Nous avons donc préparé un certain nombre d'échantillons de sérum de Cheval dilué au 1/10 (série A) et du sérum au 1/10 préalablement délipidé (série B). A chaque échantillon nous avons ajouté un volume varié de solution de molybdate d'ammonium à 5 p. 100 et partout nous avons complété à un même volume avec de l'eau physiologique. Nous avons enfin dosé les protéines dans les précipités formés. Le tableau XVII, auquel correspondent les courbes de la figure 17, rend compte de nos résultats.

TABLEAU XVIII

Volume (cm^3) de solution de molybdate par cm^3 de sérum dilué au 1/20	Série A : protéines précipitées (mg)	Série B : protéines précipitées (mg)
0	0	0
0,025	0,42	0,47
0,05	1,43	1,46
0,10	1,79	1,64
0,15	1,55	0,53
0,20	1,37	1,30
0,25	1,26	0,98
0,50	0,56	0,47
0,75	0,40	0,22
1,00	0,14	0,14
1,25	0,14	0,14

Nous avons effectué une deuxième expérience, mais cette fois nous avons mis en jeu un sérum dilué au 1/20, le même mode opératoire étant utilisé.

Dans le tableau XVIII se trouvent consignés nos résultats.

L'examen du tableau et des courbes montre que les lipides des cénapses lipidoprotéidiques n'exercent qu'une influence très minime sur la précipitation des protéines sériques par le molybdate d'ammonium.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE VI

Nous avons étudié dans ce chapitre l'influence exercée par les lipides des cénapses sur la précipitation des protéines sériques par le molybdate d'ammonium. Cette influence s'est révélée très minime.

CHAPITRE VII

MOLYBDATE D'AMMONIUM ET PHÉNOMÈNE D'OBSTACLE DE DONAGGIO

Nous avons eu l'occasion, dans notre introduction, de parler du phénomène d'obstacle de Donaggio qui utilise le molybdate d'ammonium. Cet auteur a montré que certaines urines possèdent la propriété d'empêcher la précipitation de la thionine par le molybdate d'ammonium. Ces urines proviennent toujours d'individus fatigués; aussi, la réaction de Donaggio a-t-elle été considérée comme un bon test de la fatigue.

La cinétique de cette réaction a été complètement élucidée (Tayeau et Neuzil [119]), la substance responsable du phénomène d'obstacle isolée (Tayeau [115]) et sa constitution chimique parfaitement établie (Tayeau, Biserte, Montreuil et Mme Marquevielle [116]).

En collaboration avec Tayeau et Neuzil, nous avons participé à l'étude du mécanisme de la réaction en recherchant les substances et les liquides biologiques susceptibles d'inhiber la précipitation de la thionine par le molybdate d'ammonium. Nous nous sommes arrêtés au sérum sanguin qui possède cette propriété. Nous avons tout de suite pensé que cette inhibition devait présenter des valeurs différentes suivant que l'on s'adresse à du sérum total ou à diverses fractions protéidiques. Nous avons donc préparé des solu-

tions extrêmement diluées de sérum et de diverses fractions protéidiques et, sur chacune d'elles, nous avons effectué la réaction de Donaggio.

Nous avons apprécié l'intensité de la réaction en utilisant l'échelle de comparaison mise au point par Tayeau [115]; cette échelle donne des valeurs qui varient de 0 à 10 (*).

Pour cette étude, que nous avons rendue quantitative, nous avons utilisé des solutions de sérum ou de fractions protéidiques dont la teneur en protéines oscillait entre 0 et 20 p. 10.000. Le tableau XIX rend compte de nos résultats.

A ce tableau correspondent les courbes de la figure 18.

L'examen du tableau et des courbes permet de mettre en évidence un phénomène aisément prévisible à la lumière des résultats que nous avons précédemment établis. Nous constatons, en effet, que la réaction de Donaggio se montre très positive avec les albumines, légèrement positive avec les pseudoglobulines, le sérum se plaçant entre les pseudoglobulines et les albumines, négative avec les euglobulines Ces constatations sont absolument parallèles à la solubilité des diverses fractions protéidiques dans les solutions de molybdate d'ammonium. Ces faits permettent d'expliquer le mécanisme de la réaction de Donaggio.

On comprend, en effet, que les albumines en présence de molybdate restent en solution et adsorbent le colorant sur leur molécule; la solution est donc colorée. Au contraire, les euglobulines, qui elles aussi adsorbent le colorant, précipitent en présence de molybdate et entraînent avec elles la thionine. La réaction est donc négative. Les pseudoglo-

(*) La réaction de Donaggio comporte plusieurs mélanges désignés par les lettres A, A', A", A"', B, B', etc. Cependant, pour ces essais purement scientifiques, nous nous sommes contenté d'effectuer simplement la réaction « A » qui consiste à ajouter à 2 cm³ d'urine ou de solution protéidique, 2 cm³ d'une solution de molybdate d'ammonium à 4 p. 100, à agiter, à ajouter ensuite 1 cm³ d'une solution de thionine à 1 p. 1.000, à agiter de nouveau et à laisser reposer pendant vingt-quatre heures. Si la réaction est positive, le liquide est coloré plus ou moins; si, au contraire, elle est négative, on observe un précipité violet surmonté d'un liquide jaunâtre ou incolore.

TABLEAU XIX

Concentration en protéines de la solution utilisée (p. 10.000)	Intensité de la réaction			
	Sérum	Euglobulines	Pseudo-globulines	Albumines
0	0	0	0	0
1	0	0	0	0,25
2	0	0	0	0,7
4	0,5	0	0,25	7
6	2,3	0	0,15	7,5
8	3	0	2,3	8,7
10	3	0	2,3	9
12	3,5	0	2,3	9
14	3,5	0	2,7	9,5
16	3,7	0	2,7	10
18	3,7	0	2,7	10
20	3,7	0	2,7	10

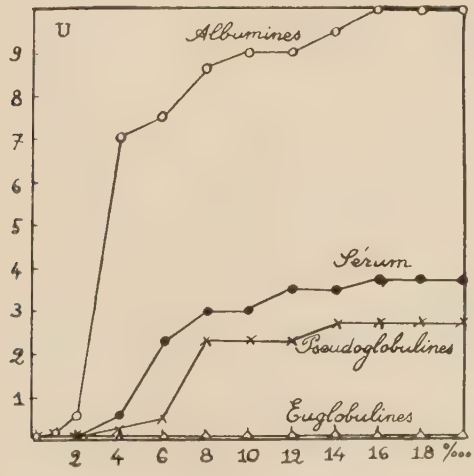

FIG. 18.

Courbes représentatives des variations de l'intensité de la réaction de DONAGGIO en fonction de la concentration en protéines.

bulines et le sérum se placent entre ces deux extrêmes.

La réaction de Donaggio, lorsqu'elle est positive, est donc due à l'adsorption de la thionine par une grosse molécule non précipitable par le molybdate d'ammonium. Cette grosse molécule est en réalité une mucoprotéine (Tayeau, Biserte, Montreuil et Mme Marquevielle [116]). Il s'agit d'un phénomène colloïdal, comme l'avaient prévu jadis Sollazo et Cortese [110].

CONCLUSIONS DU CHAPITRE VII

Nous avons étudié dans ce chapitre le phénomène d'obstacle de Donaggio à la lumière de nos résultats précédemment exposés, et nous avons montré que la positivité de la réaction est due à l'adsorption de la thionine sur une grosse molécule non précipitable par le molybdate d'ammonium.

CHAPITRE VIII

MISE AU POINT D'UN NOUVEAU TEST DE DYSFONCTIONNEMENT HÉPATIQUE

Les divers tests de dysfonctionnement hépatique basés sur les dysprotéinémies ne sont peut-être pas spécifiques au sens strict du terme, mais ils signent la plupart du temps des affections hépatiques. Quelles sont donc les dysprotéinémies observées ?

Elles correspondent surtout à une diminution notable de la fraction albumine et à une augmentation de la γ-globuline qui, chez l'Homme, représente, non pas en totalité mais en grande partie, les euglobulines. Le « céphaline-cholestérol test » de Hanger, par exemple, est toujours positif avec une γ-globuline pure, mais le caractère positif est inhibé par la présence de la sérum albumine, si bien que le sérum total normal se montre négatif vis-à-vis de ce test. Lorsque la sérum albumine vient à diminuer, le pouvoir inhibiteur diminue de même et le sérum arrive alors à donner un test positif (Kabat, Hanger, Moore et Landow [51]). Le molybdate d'ammonium se conduit d'une façon parallèle. Nous avons vu, en effet, qu'il insolubilise les euglobulines, mais que cette insolubilisation est inhibée par la présence des albumines.

Enfin, nous avons rappelé l'inconvénient présenté dans certains cas (thymol-test) par les modifications de la lipé-

mie; ces modifications ne sont pas à craindre ici, les lipides n'intervenant que très peu dans la précipitation des protéines par le molybdate d'ammonium.

Le molybdate d'ammonium nous est donc apparu comme un excellent réactif permettant de mettre en évidence les dysprotéinémies.

Pour mettre au point, dans le domaine pratique, le test au molybdate, il faudrait réaliser de nombreux essais sur le sérum de malades et étudier le molybdate d'ammonium a de nombreuses concentrations. Nous n'avons pu réaliser une telle étude qui demande un matériel clinique considérable; nous l'avons simplement esquissée, laissant à d'autes, plus orientés que nous vers la clinique, le soin de parfaire nos observations.

Nous nous contenterons de mentionner, pour un certain nombre de malades hépatiques, la plupart atteints de cirrhose, les chiffres obtenus pour le rapport albumines/globulines (*) et le test au molybdate. Ce dernier consiste à ajouter à 1 cm^3 de sérum, 0,05 cm^3 de solution de molybdate d'ammonium à 5 p. 100; le précipité qui apparaît dans ces conditions est recueilli et le dosage des protéines est effectué selon la technique précédemment décrite; le résultat est fourni par le chiffre trouvé à l'appareil de Meunier.

Signalons que nous avons effectué un certain nombre de mesures sur des sérums normaux; dans tous les cas, nous avons trouvé des chiffres qui oscillent entre 75 et 100.

(*) Nous remercions très vivement M^lle^ A. Liermain, ex-Interne des Hôpitaux, Assistante à la Faculté, qui nous a fourni les sérums que nous avons étudiés, dans lesquels avait été préalablement déterminé le rapport A/G.

Résultats

TABLEAU XX

A/G	Test	A/G	Test	A/G	Test
0,25	163	0,62	130	1,13	92
0,30	185	1,04	90	0,50	120
0,53	143	0,72	125	0,46	119
1,55	80	0,26	157	0,96	115
0,50	144	0,25	150	0,87	106
0,41	155	0,25	145	0,99	125
0,21	211	0,20	148	1,29	85
0,81	101	0,93	110	0,54	125
0,42	163	0,66	110	0,21	160
0,32	172	0,43	130	0,24	140
0,17	235	0,28	148	0,68	109
0,45	140	0,79	110	0,20	197
0,60	145	0,47	128	1,20	78
0,26	167	0,82	127	0,22	145
0,30	145	0,19	195	0,40	126
0,51	148	1,27	91	0,51	123

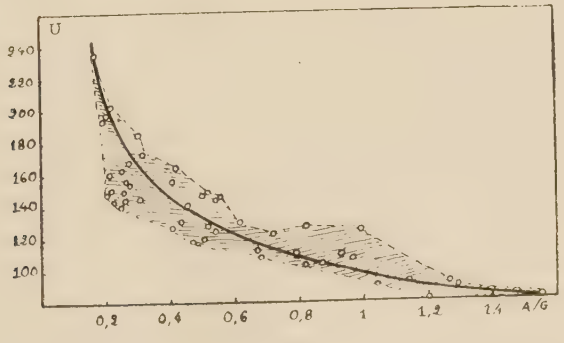

Fig. 19.

Avec ces chiffres, nous avons tracé un graphique (fig. 19) dans lequel les valeurs du rapport albumines/globulines ont été indiquées en abscisses et le chiffre correspondant du test au molybdate en ordonnées. L'examen de ce gra-

phique montre que, grossièrement, la valeur du test suit le rapport A/G. Il est bien certain que d'autres facteurs influent sur ce test, entre autres la protéinémie totale et la lipémie, lorsqu'elle est très élevée. Ces facteurs sont d'ailleurs mis à profit dans le diagnostic biologique des affections hépatiques.

Nous espérons que ces quelques données sur ce nouveau test engageront les biologistes cliniciens à effectuer des recherches sur sa valeur dans le diagnostic des affections hépatiques, ce qui illustrera la parole du Maître Bordelais V. Pachon : « L'herbe ne pousse plus désormais sur le chemin qui relie la Faculté à l'Hôpital ».

CONCLUSIONS DU CHAPITRE VIII

Nous proposons un nouveau test biologique pour l'exploration fonctionnelle hépatique. Ce test suit en grande partie le rapport albumines/globulines.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Après avoir rappelé les diverses méthodes de fractionnement des protéines sériques et l'intérêt présenté par l'étude des dysprotéinémies en pathologie hépatique, nous avons effectué une étude théorique sur le molybdate d'ammonium.

Nous avons envisagé ensuite l'action du molybdate d'ammonium sur le sérum sanguin et sur les trois grandes fractions protéidiques sériques : euglobulines, pseudoglobulines, albumines.

Le molybdate d'ammonium précipite une partie des protéines du sérum sanguin et il existe une concentration optimum en molybdate pour laquelle la précipitation atteint une valeur maximum. Cette constatation s'explique par les modifications de *p*H apportées au sérum par le molybdate qui forme des complexes avec les protéines. La concentration optimum en molybdate, qui dépend de la teneur en protéines de la solution étudiée, permet d'envisager l'existence d'associations globulines-albumines.

Le molybdate d'ammonium précipite la totalité des euglobulines et une partie des pseudoglobulines; au contraire, il ne précipite pas du tout les albumines.

Le *p*H jouant un rôle essentiel dans la précipitation des protéines sériques par le molybdate, nous avons étudié systématiquement ce facteur et nous avons pu préciser le *p*H optimum de précipitation des diverses fractions protéidiques.

Ces diverses fractions se conduisent très différemment

suivant qu'elles se trouvent isolées du sérum ou accompagnées des autres fractions. Nous avons donc porté notre attention sur l'influence exercée par les albumines et les pseudoglobulines sur la précipitation des euglobulines, et nous avons noté que les albumines principalement exercent un effet inhibiteur sur la précipitation des euglobulines par le molybdate d'ammonium.

Après avoir prouvé que les lipides des cénapses lipido-protéidiques ne modifient pas d'une manière appréciable la précipitation des protéines par le molybdate, nous avons montré tout le parti que l'on pouvait tirer de ces deux dernières constatations (effet inhibiteur exercé par les albumines sur la précipitation des euglobulines; influence minime des lipides sériques) pour l'établissement d'un nouveau test de dysfonctionnement hépatique.

Nous avons utilisé nos résultats pour expliquer le mécanisme de la réaction d'obstacle de Donaggio, qui met justement en jeu l'action exercée par le molybdate d'ammonium sur certaines glucoprotéines urinaires.

Enfin, nous avons esquissé une étude sur le sérum de malades atteints d'affections hépatiques diverses.

Vu :
Pour le Doyen :
L'Assesseur,
R. SIGALAS.

Vu, bon à imprimer :
Le Président,
F. TAYEAU.

Vu et permis d'imprimer :
Bordeaux, le 8 Juillet 1953.
Le Recteur,
E. DELAGE.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ardry R. — *Ann. Biol. Clin.*, 1952, **10**, 575.
2. Astrup T. & Birch-Andersen A. — *Nature*, 1947, **160**, 637.
3. Baudouin A., Lewin J. & Hillion P. — *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 604.
4. Bennet E. L. & Niemann G. — *J. Biol. Chem.*, 1948, **176**, 969.
5. Bock J. — *Nord Med.*, 1947, **35**, 1705.
6. Bonot A. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1945, **27**, 495.
7. Boutaric A. — *Protoplasma*, 1933, **18**, 286.
8. Boutroux A. — *C. R. Acad. Sc.*, 1931, **192**, 854.
9. Bricq R., Gager A. & Lacapère J. — *Ann. Biol. Clin.*, 1948, **6**, 368.
10. Burkhardt A. E. — *Arch. exp. Path.*, 1883, **16**, 322.
11. Campbell W. R. & Hanna M. I. — *J. Biol. Chem.*, 1937, **119**, 9.
12. Carrière E. & Guiter H. — *Bull. Soc. Chim.*, 1945, 5e s., **12**, 74.
13. Carrière E. & Guiter H. — *Bull. Soc. Chim.*, 1945, 5e s., **12**, 329.
14. Caujolle F. & Roche P. — *Bull. Acad. Méd.*, 1935, **113**, 489.
15. Chiray M. — *Bull. Assoc. Etudes Physiopath. Foie Nutr.*, 1950, **5**, 11.
16. Cohn E. J. & coll. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 465.
17. Cohn E. & Edsall J. — Proteins aminoacids, 1 vol., Rheinhold édit., New-York, 1943; et Edsall J. — *Adv. Prot. Chem.*, 1947, **3**, 437.
18. Commaille, cité par Robin C. — Essais sur les humeurs normales et morbides du corps de l'Homme, 1 vol., Baillière édit., Paris, 1874.
19. Cremer H. D. & Tiselius A. — *Biochem. Z.*, 1950, **320**, 273.
20. Delage B. — Thèse Sc., Paris, 1939.
21. Delore P., Brun & Rochette. — *J. Méd. Lyon*, 1949, **30**, 901.
22. Delsal J.-L. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947, **29**, 690.
23. Denis P. — Nouvelles études chimiques, 1 vol., Baillière édit., Paris, 1856.

24. Denis P. — Mémoire sur le sang, 1 vol., Baillière édit., Paris, 1859.
25. Dirr K. — *Z. ges. exp. Med.*, 1944, **114**, 127.
26. Donaggio A. — *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 1933, **8**, 1456.
27. Durrum E. L. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 2943.
28. Emrich R. — *Z. ges. Inn. Med. Grenz.*, 1952, **7**, 316.
29. Fasoli A. — *Arch. Sc. Biol.*, 1950, **34**, 150 et *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 1951, **27**, 1456.
30. Fasoli A. & Bonelli M. — *Arch. Sc. Biol.*, 1950, **34**, 160 et *Minerva Med.*, 1951, **2**, 1.
31. Fauvert R. & Hartmann L. — *Bull. Assoc. Etudes Physiopath. Foie Nutr.*, 1950, **5**, 155.
32. Fiero del Rio L., Arrieta-Aupart D. & Canovega. — *Rev. Med. Hosp. Gen. Mex.*, 1948, **11**, 202.
33. Flandin C., Lecoq L., Maison & Thiroloix P. L. — *Bull. Mém. Soc. Hôp. Paris*, 1930, **46**, 1823.
34. Freudenberg R. & Stumpf W., *in* Stumpf W. — Thèse, Heidelberg, 1941 et *in* Jerchel D. — *Rev. Germ. Sc. Biochem.*, 1947, **1**, 59.
35. Fuente-Hira F. — *Ann. Biol. Clin.*, 1950, **8**, 494.
36. Fuld E. & Spiro K. — *Z. physiol. Chem.*, 1900, **31**, 132.
37. Goiffon R. — *Ann. Biol. Clin.*, 1948, **6**, 372.
38. Gras H. — *Rev. Esp. Fisiol.*, 1950, **6**, 113 et 1951, **7**, 265.
39. Halliburton. — *J. Physiol.*, 1886, **7**, 319.
40. Hanger F. M. — *J. Clin. Inv.*, 1939, **18**, 261.
41. Hardy W. B. & Gardiner S. — *J. Physiol.*, 1910, **40**, LXVIII.
42. Henriques & Klausen, d'après [3].
43. Hewitt L. F. — *Biochem J.*, 1938, **32**, 26.
44. Hofmeister F. — *Arch. exp. Path. Pharm.*, 1889, **25**, 1 et **27**, 395.
45. Homer A. — *Biochem. Z.*, 1889, 278.
46. Hooft G. — *J. Physiol. Path. Gen.*, 1938, **36**, 652.
47. Howe. — *J. Biol. Chem.*, 1921, **49**, 93.
48. Jager B. V., Schwartz T. B., Smith E. L., Nickerson M. & Brown D. M. — *J. Lab. Clin. Med.*, 1950, **35**, 76.
49. Jameson E. & Roberts D. B. — *J. Gen. Physiol.*, 1937, **20**, 475.
50. Jorgensen. — *Skand. Arch. Physiol.*, 1931, **61**, 134.
51. Kabat E., Hanger F. M., Moore & Landow. — *In* Tayeau F. et Neuzil E. — XXVII[e] Congr. Franç. Méd., Genève, 1949, p. 53.
52. Kalcheva D. — *Ann. Univ. Sofia II, Fac. Phys. Math.*, 1934, **30**, 61.
53. Kauder G. — *Arch. exp. Path. Pharm.*, 1886, **20**, 411.
54. Kibrick A. C. & Blonstein M. — *J. Biol. Chem.*, 1948, **176**, 983.
55. Kuhne. — *Lehrb. physiol. Chem.*, 1886, 175.

56. Kunkel H. G. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1947, **66**, 217.
57. Lehmann. — *Lehrb. Physiol.*, 1862, 428, d'après Lambling E. — Encyclopédie chimique, 1 vol., Flammarion édit., Paris, 1895.
58. Lever W. F., Gurd F. N., Uroma E., Brown R., Barnes B. A., Schmidt K. & Schultz E. L. — *J. Clin. Inv.*, 1951, **30**, 99.
59. Lewin J. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, **30**, 3906.
60. Lewith S. — *Arch. exp. Path.*, 1888, **24**, 1.
61. Loomeijer F. J. — *Nature*, 1950, **166**, 951.
62. Mc Farlane A. S. — *Biochem. J.*, 1935, **29**, 1209.
63. Machebœuf M. — Etat des lipides dans la matière vivante, 1 vol., Hermann édit., Paris, 1937.
64. Machebœuf M. — *Exp. Ann. Biochim. Méd.*, 1951, **13**, 185.
65. Machebœuf M. — XXVII[e] Congr. Franç. Méd., Genève, 1949, p. 5.
66. Machebœuf M., Dubert J. M., Slizewicz P. & Rebeyrotte P. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, sous presse.
67. Machebœuf M. & Duboy J. — *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **132**, 272.
68. Machebœuf M. & Januskiewicz M. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1937, **19**, 694.
69. Machebœuf M., Lacaille P. & Rebeyrotte P. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947, **29**, 402.
70. Machebœuf M. & Monnier A. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1942, **68**, 488.
71. Machebœuf M., Rebeyrotte M. & Brunerie M. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1951, **33**, 1543.
72. Machebœuf M. & Sandor G. — *C. R. Acad. Sc.*, 1932, **194**, 1102.
73. Machebœuf M. & Tayeau F. — *C. R. Acad. Sc.*, 1938, **206**, 860.
74. Machebœuf M. & Tayeau F. — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 1184.
75. Machebœuf M., Tayeau F. & Battut V. — *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 481.
76. Mc Lagan N. F. & Bunn D. — *Biochem. J.*, 1947, **41**, 580.
77. Majoor C. L. H. — *Yale J. Biol. Med.*, 1946, **18**, 419 et *J. Biol. Chem.*, 1947, **169**, 583.
78. Malaprade L. — *Ann. Chim.*, 1929, **159**, 104.
79. Marcus E. — *Z. physiol. Chem.*, 1899, **28**, 559.
80. Marquevielle J. — Travail inédit.
81. Martin N. H. — *Nature*, 1948, **162**, 145.
82. Michailow. — *Maly's Jahresb.*, 1884, **14**, 7.
83. Milhaud G. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **77**, 170.
84. Milne J. — *J. Biol. Chem.*, 1947, **169**, 595.
85. Mulder. — Cité d'après Robin C. [voir 18].
86. Neuzil E. — II[e] Congr. Intern. Biochim., Paris, 1952, p. 400.

87. Panum. — *Wirch. Arch.*, 1851, **3**, 251.
88. Pavolini T. — *Chem. Abstr.*, 1930, **23**, 2664.
89. Pérez J. J. — Thèse Sc., Paris, 1939.
90. Pillemer L. & Hutchinson M. G. — *J. Biol. Chem.*, 1945, **158**, 299.
91. Pinkus. — *J. Physiol.*, 1901, **27**, 57.
92. Pohl J. — *Arch. exp. Path. Pharm.*, 1886, **20**, 246.
93. Polonovski J. — Thèse Sc., Paris, 1950.
94. Porges & Spiro K. — *Beitr. chem. Physiol. Path.*, 1903, **3**, 277.
95. Quinnan. — *Beitr. chem. Physiol. Path.*, 1904, **5**, 95.
96. Rapoport M., Rubin M. I. & Chaffee D. — *J. Clin. Inv.*, 1943, **22**, 487.
97. Reid A. F. & Jones F. — *Am. J. Clin. Path.*, 1949, **19**, 10.
98. Roche A., Dorier M. & Samuel L. — *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **121**, 1019.
99. Roche A., Samuel L. & Arthaud R. — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **125**, 1061.
100. Roche J. & Derrien Y. — *Exp. Ann. Biochim. Méd.*, 1945, **5**, 33.
101. Rosenheim. — *Z. anorg. Chem.*, 1916, **96**, 139.
102. Saias E. — Thèse Pharm., Paris, 1942.
103. Sandor G., Bonnefoi A. & Pérez J. J. — *C. R. Acad. Sc.*, 1938, **197**, 1254.
104. Scherer. — Cité d'après Robin G. [voir 18].
105. Schmidt V. — *Arch. Anat. Physiol.*, 1862, **48**, 428.
106. Schmitz A. — *Biochem Z.*, 1931, **241**, 271.
107. Schwert M. H. & Neurath H. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 2784.
108. Servantie L. — *In* Jourdain A. M. — Thèse Méd., Bordeaux, 1946.
109. Sœrensen S. P. L. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1925, **47**, 457.
110. Sollazo G. & Cortese V. — *Boll. Chim. Farm.*, 1935, **74**, 625.
111. Starke K. V. — *Maly's Jahresb.*, 1881, **11**, 17.
112. Svanberg & Struve. — *J. prakt. Chem.*, 1848, **44**, 257 et 1851, **54**, 288.
113. Tayeau F. — *C. R. Acad. Sc.*, 1941, **212**, 575.
114. Tayeau F. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, **26**, 293.
115. Tayeau F. — *Tunisie Méd.*, 1951, **29**, 664.
116. Tayeau F., Biserte G., Montreuil J. & M^me^ Marquevielle S. — *C. R. Acad. Sc.*, 1953, sous presse.
117. Tayeau F. & Florentin-Martin M. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1945, **27**, 314.
118. Tayeau F. & Martin M. — *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 503.
119. Tayeau F. & Neuzil E. — *L'Homme sain*, 1950, **1**, 244.
120. Taylo H. L. & Keys A. — *J. Biol. Chem.*, 1943, **148**, 379.

121. Travers A. — *In* Pascal P. — Traité de chimie minérale, 12 vol., Masson & C^ie^ édit., Paris, 1932.
122. Travers A. & Malaprade L. — *Bull. Soc. Chim.*, 1926, 4^e^ s., **39**, 1408.
123. Travers A. & Malaprade L. — *Bull. Soc. Chim.*, 1926, 4^e^ s., **39**, 1543.
124. Traverse M. de & Depraitère R. — *Am. Biol. Clin.*, 1948, **6**, 95.
125. Ullik. — *Wien. Akad. Ber.*, 1869, **60**, 295 et *Ann. Chem.*, 1870, **153**, 368.
126. Werncke. — *Z. anal. Chem.*, 1875, **14**, 14.
127. Wierner H. — *Z. physiol. Chem.*, 1911, **74**, 29.
128. Wuhrmann F. & Wunderly G. — Die Blutweisskörper des Menschen, 1 vol., Benno Schwabe & C^ie^ édit., Bâle, 1947.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

Introduction 7

Chapitre premier. — Le fractionnement des protéines sériques 11

I. Fractionnement par divers sels 12
a) Fractionnement par le sulfate de sodium. 13
b) Fractionnement par le sulfate d'ammonium 13

II. — Fractionnement par les solvants organiques 14

III. — Fractionnement par les résines et par les détergents 15

IV. — Fractionnement au moyen de l'électrophorèse.... 15

V. — Fractionnement des globulines 17

VI. — Fractionnement des albumines 18

VII. — Les tests protéidiques de dysfonctionnement hépatique 19

Chapitre II. — Le molybdate d'ammonium 22

I. — Les molybdates alcalins..... 23

II. — Les molybdates d'ammonium 24

III. — Préparation et stabilité des molybdates d'ammonium 24

IV. — Considérations sur les solutions de molybdate d'ammonium et leur composition 26

Conclusions du chapitre II 28

Chapitre III. — Action du molybdate d'ammonium sur les protéines du sérum sanguin 29

I. Essais préliminaires 29

Pages

II. — A la recherche d'une technique permettant le dosage rapide et exact des protéines sériques.. 32

III. — Etude quantitative concernant l'action du molybdate d'ammonium sur le sérum total de Cheval. 33

IV. — Etude quantitative concernant l'action du molybdate d'ammonium sur les euglobulines du sérum de Cheval 41

V. — Etude quantitative concernant l'action du molybdate d'ammonium sur les pseudoglobulines du sérum de Cheval 44

Conclusions du chapitre III 46

CHAPITRE IV. — LA PRÉCIPITATION DES PROTÉINES SÉRIQUES PAR LE MOLYBDATE D'AMMONIUM EN FONCTION DU *p*H 47

I. Etude en milieu dilué..... 47

a) Essais sur les euglobulines..... 47

b) Essais sur les pseudoglobulines 49

c) Essais sur les albumines..... 50

d) Essais sur le sérum total 50

II. — Etude du phénomène en milieu plus concentré... 52

a) Essais sur les euglobulines..... 53

b) Essais sur les pseudoglobulines 54

c) Essais sur les albumines 54

Conclusions du chapitre IV 57

CHAPITRE V. — INFLUENCE JOUÉE PAR LES PROPORTIONS RESPECTIVES DES DIVERSES FRACTIONS PROTÉIDIQUES DU SÉRUM SUR LE POUVOIR PRÉCIPITANT DU MOLYBDATE D'AMMONIUM 58

I. — Pouvoir inhibiteur des albumines 58

II. — Pouvoir inhibiteur des pseudoglobulines 60

III. — Influence du rapport albumines/globulines dans la précipitation des globulines sériques par le molybdate d'ammonium 61

IV. — Nature électrophorétique des protéines précipitées par le molybdate d'ammonium 63

Conclusions du chapitre V 64

CHAPITRE VI. — RÔLE DES LIPIDES DANS LA PRÉCIPITATION DES PROTÉINES SÉRIQUES PAR LE MOLYBDATE D'AMMONIUM 65

Conclusions du chapitre VI 68

Pages

Chapitre VII. — Molybdate d'ammonium et phénomène d'obstacle de Donaggio 69

Conclusions du chapitre VII 72

Chapitre VIII. — Mise au point d'un nouveau test de dysfonctionnement hépatique 73

Conclusions du chapitre VIII 76

Conclusions générales 77

Bibliographie 79

Bordeaux. — Impr. E. Drouillard, place de la Victoire, 3.